第 XXII 巻, 第 4-5 号

Vol. XXII, No. 4-5

日　本
植物病理學會報©

ANNALS OF THE PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY OF JAPAN

昭和 32 年 12 月

December 1957

日本植物病理學會

THE PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY OF JAPAN

東　京

TOKYO

日本植物病理学会報 第 XXII 巻 第 4・5 号

目　次

原　著

雑　録

On the hot bath water treatment of wheat seed for the control of loose smut, *Ustilago tritici* Rostrup*

Hazime YOSHII and Shigeo YAMAMOTO

A. Bath water seed soaking method

First of all we shall have to explain about our usual manner of taking a bath and about some kinds of bath-tubs which are common in the Japanese countryside (Fig. 1 and Fig. 2). We are accustomed to washing ourselves outside the tub as though taking a shower, then using the tub two or three times, usually 1 to 2 minutes per person. The temperature of water is usually kept at about 42° to 44° C., and the tub is heated gently by the attached oven during the bathing.

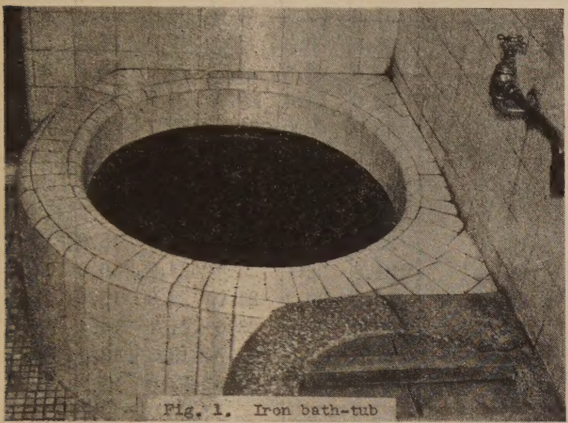


Fig. 1. Iron bath-tub

The bath water seed soaking method for the control of loose smuts of wheat and barley was devised at about 1920(1,2). Owing to its high validity and simplicity the method was soon accepted by many farmers. The method is as follows: After the temperature of the water has risen to 45° to 46° C., the oven fire is entirely put out. Wheat or barley seed in a package whose capacity is about 15 liters, is suspended in the water and th container, with a slightly opened lid, is allowed to remain there for about 10 hours until the water temperature descend down to about 25° C.

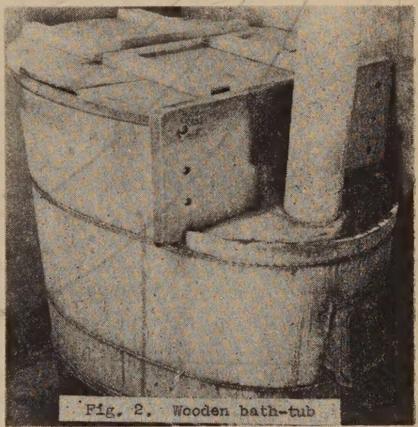


Fig. 2. Wooden bath-tub

B. Temperature depression of bath water

We intended to ascertain the mode of depression oh water temperature under the above stated method wit bathtubs of several different structures and water depths, and to ascertain the time required for seed soaking for the control of loose smut of wheat. We employed for this purpose three kinds of bath-tubs, namely a mortar-tub (Fig. 3), an iron-tub (Fig. 4), and a wooden-tub (Fig. 5). Each of them had about 300 liters capacity.

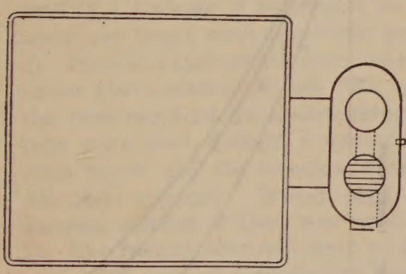


Fig. 3. Plan of mortar-tub

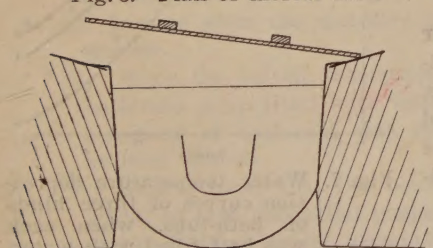


Fig. 4. Section of iron-tub

The results obtained from the experiment concerning the rate of temperature depression of water, in cases of wooden-tubs with several different kinds of water depths, are given in Table 1 and Fig. 6. From the results, it is evident that the velocity of temperature fall of water at a definite time is proportional to the temperature at that time, and the depression curve of water temperature (θ) will be represented (4) by the exponential formula, $\theta=\theta_0{}^{-\alpha t}$ where θ_0 is the initial temperature of water, t is the time elapsed from the beginning, and α is a costant. In case the quantity of water in the tub is larger the temperature

* Contribution from the Laboratory of Plant Pathology, Kyushu University, Fukuoka, Japan

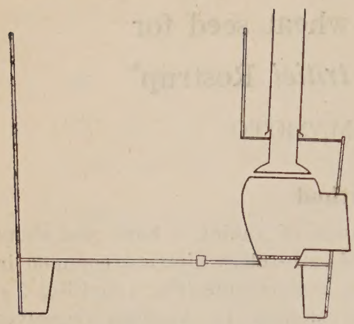


Fig. 5. Section of wooden-tub.

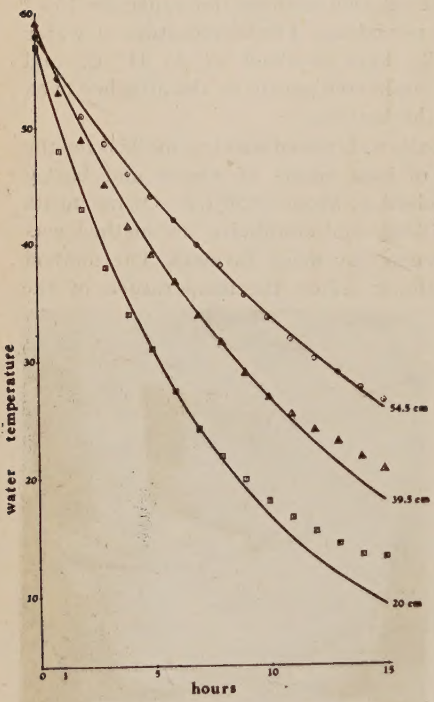


Fig. 6. Water temperature depression curves of wooden-tubs, when water depths were varied.

depression is smaller as it is presented in Fig. 6.

Table 1. Temperature depression of water wooden-tubs of various water depths.

Water depth	54.5 cm		39.5 cm		20 cm	
Hours after soaking	Obse-rved	Calcu-lated	Obse-rved	Calcu-lated	Obse-rved	Calcuolated
0	58.0	58.0	59.0	59.0	57.0	57.0
1	54.0	55.0	53.0	54.5	48.0	50.5
2	51.0	52.1	48.9	50.4	43.0	44.6
3	48.6	49.3	45.0	46.3	38.0	39.5
4	46.0	46.8	41.5	43.0	34.0	35.0
5	44.0	44.3	39.0	39.7	31.0	30.9
6	42.0	42.0	36.6	36.7	27.4	27.4
7	40.0	39.8	34.0	33.9	24.0	24.2
8	38.1	37.7	31.5	31.4	21.8	21.4
9	35.6	35.7	28.9	29.0	19.8	19.0
10	33.6	33.8	26.8	26.8	18.0	16.8
11	31.8	32.1	25.4	24.7	16.6	14.9
12	30.1	30.4	24.0	22.9	15.4	13.1
13	28.8	28.8	23.0	21.1	14.4	11.6
14	27.6	27.3	21.7	19.5	13.4	10.3
15	26.5	25.8	20.6	18.0	13.2	9.1
Room temp	7.5—16.5		7—11		6.75—10	

Calculated numbers were obtained from the formula $\theta=\theta_0 e^{-\alpha t}$

Fig. 7 shows the results of the experiment when these three kinds of tubs were compared. In this case, each tub was kept nearly half of full water. This figure shows that the temper. ature depression curves are somewhat different from each other. In the case when tubs were nearly filled with water, no decided difference between the temperature fall curves of these three kinds of tubes was observed, though the data were not presented here.

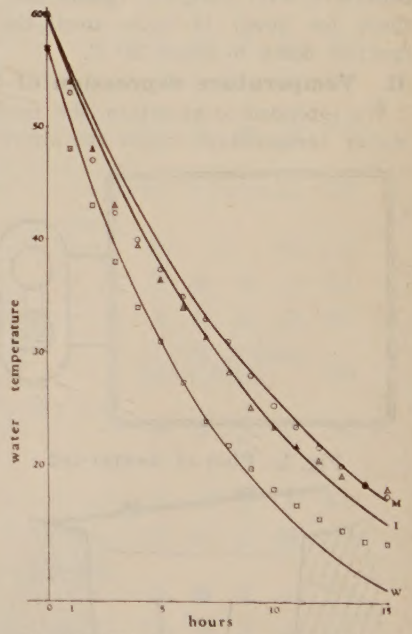


Fig. 7. Water temperature depression curves of three kinds of bath-tubs, when each was half filled with water. N: mortar-tub, I: iron-tub, W: wooden-tub

C. Wheat seed soaking experiment with bath water

The bath-tub employed for the wheat seed soaking experiment was a wooden-tub nearly equal in size to the one above, and was nearly filled with water. Wheat seed, which had been infected with loose smut on the previous year by the partial vacuum method of Oort (3) was used for the experiment.

After the water temperature was adjusted at 46°C., 21 packages each filled with 10g. of smut affected seed, were suspended in the water. At each time interval as given in

Table 2, three packages were pulled out from the tub and drenched in cold water for 5 minutes. Wheat seed steeped for 5 minutes in cold water was used for the control. On Dec. 12th 200 grains from each of the packages were sown in field. At the heading time the number of the smut affected plants was counted. The results are given in Table 2 and Fig. 8. It is obvious from these data that the hot bath water method is quite effective when seed soaking time is kept not less than 5 hours. While no ill-effect on the germination capacity is observed even when smut affected seed is soaked for 10 hours as given in Table 3.

Table 2. Seed soaking hours by the bath water method and the percentage of the smutted wheat plants.

Soaked hours	0	1	2	3	4	5	10
I	49.5	33.1	10.8	2.9	2.7	0	0
II	54.3	29.9	11.3	3.7	2.4	0	0
III	—	31.2	24.3	13.6	2.3	1.7	1.2

Table 3. Germination percentage of the smut affected seed (50 grains) treated with the bath water method.

Soaked hours	0	1	2	3	4	5	10
I	90	78	98	90	100	84	74
II	100	92	84	90	100	94	96
III	—	98	84	100	96	90	98

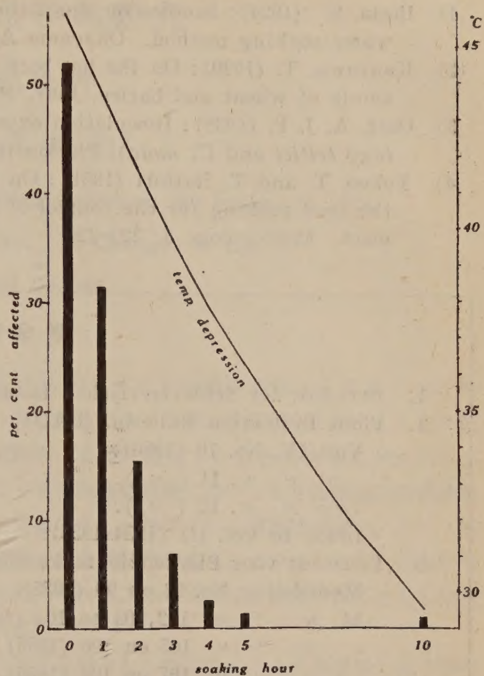


Fig. 8. Sead soaking hours by the hot bath water method and their efficiencies for the control of loose smut of wheat.

Summary

1) The bath water seed disinfection method, which is widely used in Japan for the control of loose smut of wheat, *Ustilago tritici*, is as follows:

After temperature of the bath water has risen to 45° or 46°C., the oven fire is put out. Wheat seed in a package is suspended in the hot water in a container with a slightly opened lid for about ten hours until the water temperature descends down to about 25°C.

2) Present experiments were carried out to ascertain the rate of decrease of water temperature under above stated method with bath-tubs of several different structures and water depths, and the time required for seed soaking for the control of loose smut of wheat. Three kinds of bath-tubs were used, namely, a mortar-tub, directly, heated with side oven, an iron-tub directly heated from below, and the common wooden-tub directly heated with side oven. Each of them had about 300 liters capacity. Wheat seed which had been inoculated with the fungus by the partial vacuum method of Oort was used.

3) The results obtained were as follows:

i) The rate of temperature decrease at a definite time was proportional to the temperature of bath water at that time.

ii) In case when the quantity of water was larger the rate of temperature decrease was smaller.

iii) When the initial temperature of hot water was kept between 46°C. to 50°C., and the bath-tubs were filled with water, the difference of the rate of temperature fall due to the structure of bath-tubs was not so great as to disturb the practical use of the bath water soaking method.

iv) It was found that five hours' soaking was sufficient for the control of the loose smut of wheat in case the initial temperature was kept at 46°C.

v) No ill-effect for the germination of wheat seed was found when the initial temperature of bath water was kept at 46°C. and the fire was put out, even if the seed was soaked for ten hours

(Recieved October 30, 1957)

Literature cited

1) Ikata, S. (1924): Studies on the disinfection of wheat and barley seed, 2: The hot bath water soaking method. Okayama Agr. Exp. St. Rept. No. 45: 1–78.

2) Kanzawa, T. (1920): On the hot bath water seed soaking method for the control of loose smuts of wheat and barley. Jour. Pl. Protect. 7: 571–576.

3) Oort, A. J. P. (1939): Inoculation experiments with loose smuts of wheat and barley (*Ustilago tritici* and *U. nuda*). Phytopath. 29: 717–728.

4) Yokoo, T. and T. Hattori (1951): On the temperature depression of the bath water during the seed soaking for the control of loose smuts of wheat and barley. Proc. west. Japan meet. Meteorology 8: 222–225.

学会寄贈図書目録

1. Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft. Band 65. (1955).
2. Plant Protection Bulletin. (FAO).
   Vol. IV, No. 10 (1956).
   〃 〃 〃. 11 (〃).
   〃〃 〃 〃. 12 (〃).
   Index to Vol. III (1954–1955).
3. Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek.
   Mededeling No. 98 en 99 (1955).
   M 〃 〃 102, 103 en 104 (1955).
   〃 〃 105 en 106 (1955).
   〃 〃 107 en 108 (1955).
   〃 〃 109 en 110 (1955).
   〃 〃 111 (1955).
   〃 〃 112 (1954).
   〃 〃 113 (1955).
   〃 〃 114, 115 en 116 (1955).
   〃 〃 117 (1955).
   〃 〃 118 (1956).
4. Bolton, A. T., Fitzpatrick, R. E., and Mellor, F. C.: Common strawberry diseases and their control. Canada Depart. Agr. Publication. 982. (1956).
5. Brown, A. M.: A check list of plant rusts in Canada. Canada Depart. Agr. Publica ion 976. (1956).
6. Bruhn, Chr.: Untersuchungen über die Botrytis-Krankheit der Gladiolen. Phytopathologische Zeitschrift. Band 24, Heft 2. (1955).
7. Campbell, J. B., Lodge, R. W., and Budd, A. C.: Poisonous plants and the Canadian prairies. Canada Depart. Agr. Publication. 900. (1956).
8. Harmon, D. B.: An equation for predicting a mean drop size in a high-speed spray] Univ. California Press. (1955).
9. Mac Collom, G. B.: Effects and correction of DDT phytotoxicity to cucumbers Memoir 339. (1956).
10. Parker, K. G., Fisher, E. G., Mills. W. D.: Fire blight on pome fruits and its control. Cornell Extension Bulletin. 966. (1956).
11. Stangler, B. B.: Origin and development of adventitious roots in stem cuttings of chrysanthemum, ca rnation, and rose. Cornell Univ. Agr. Exp. Stat. Memoir. 342. (1956).
12. Hartman, J. D. and Isenberg, F. M.: Waxing vegetables. Cornell Extension Bulletin. 965. (1955).

稲熱病斑の組織化学的研究

Ⅲ. 病斑周辺の呼吸について

豊田　栄・鈴木直治*

Sakae TOYODA and Naoji SUZUKI : Histochemical studies on the lesions of rice blast caused by *Piricularia oryzae* CAV. II. Changes in the respiration of infected tissues.

I. 緒　言

著者らは第I報で病斑の褐変が組織の抵抗と関係をもつこと，第Ⅱ報で組織の褐変が稲の含有するクロロゲン酸を主とするポリフェノールの不可逆的酸化によることを指摘した。しかしながら，クロロゲン酸或はその酸化生成物はイモチ病菌の生長を阻害し得ない[23]ことから見て，組織の褐変を単にポリフェノールの不可逆的酸化と考えるならばそれだけでは組織の抵抗を説明し得ない。高橋[16]も指摘しているように，葉鞘裏面接種の成績では高度に抵抗している細胞では褐変は起らないから，褐変は抵抗の結果の表現かも知れない。

褐変の原因物質として一応ポリフェノールがあげらたが，これを不可逆的に酸化する機作についてはまだ不明の点が多い。豊田[22]は健全な稲の葉にはポリフェノールを直接酸化する酵素の存在がみとめられず，H_2O_2 存在下で酸化の起ることから，ポリフェノールを酸化するのは peroxidase ではないかと推論した。しかしながら，H_2O_2 の存在，その生成機作については明らかでない。このような行程はおそらく組織の呼吸と関連をもつであろう。

鈴木，富沢，豊田[15]は甘藷紫紋羽病感染組織を材料として呼吸率の増加—パスツール効果—燐酸の行動の間に見られる一連の関係を見出し，それと抵抗との関連について考察を与えた。その後鈴木，豊田[14]は同じ材料について，抵抗の弱るに従い呼吸率は異常に増加し，パスツール効果を失い燐酸化中間生成物が無機燐酸を放出するにいたる過程でその呼吸の終末酸化酵素が金属酵素から非金属酵素に変ることを見出し，そのような呼吸はＡＴＰ生産という点からは能率の低いものであろうと推論した。

玉利ら[18]はイモチ病菌の産生する毒素として α-ピコリン酸とピリクラリンを証明しており，これらは金属酵素の活性を阻害することが容易に考えられるのでイモチ病感染組織においても甘藷紫紋羽病感染組織と同様なことが起きている可能性が強い。そして感染組織で非金属酸化酵素としてフラビン蛋白が働いていれば，それによつて H_2O_2 の生成されることも推定される。

このような観点から稲の葉のイモチ病感染に伴う呼吸率の増加，パスツール効果の減少，終末酸化酵素の変化の間の関連，そのような変化と抵抗との関連について検討を加えた成績を報告する。

この研究を進めるに当り有益な助言を頂いた生理科松中昭一技官，貴重なイモチ菌毒素を分譲された新潟大学玉利教授に深く感謝する。

2. 材料と方法

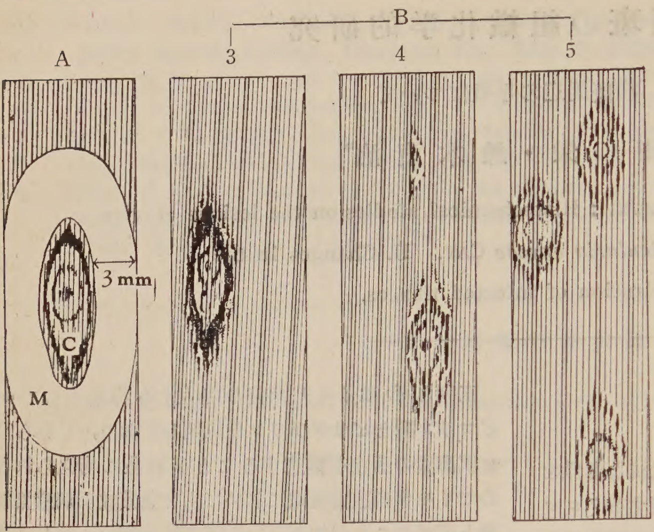
供試稲品種は愛知旭，関東 53 号，植木鉢ガラス室栽培の本葉 5～6 葉のもの及び呼吸阻害試験には1/5万ワグネルポット栽培の分けつ最盛期のものを使用した。病斑は総て人工接種により得たもので測定の直前に既報[21]に従つて病斑型を類別記載した。供試部位は第1図に示す如く，罹病の影響を最も受けていると思われる病斑外接の組織を 3 mm の巾に切取り，"病斑周辺組織" として測定に供した。呼吸の測定は総てワールブルグ検圧計を用い，25°C 暗黒下で行つた。

3. 結　果

a 病斑型による呼吸率の変化と $Q_{CO_2}^{air}/Q_{CO_2}^{N_2}$ 値の変化

各病斑型の病斑周辺組織をワールブルグ容器主室内に保ち，0.05ml の水を注加して湿度を飽和状態に保つた。また対照として同一条件下で栽培した稲の同一部位の無接種葉組織を同様に測定した。解糖率は容器

* 農林省農業技術研究所



第1図 呼吸側定に用いた病斑の型と供試組織のとり方

Fig. 1. A. The central necrotic acea (C) of the lesion is removed, and the marginal zone (M) is used for the respiration measurements. B. Types of lesions used for the measurement of respiration rate. 5: lesions on susceptible tissue, 3: lesion on resistant tissue and 4: lesions on moderately susceptible tissue.

内ガスを N_2 で置換し，無酸素下での CO_2 排出率で表わした。結果は第1表に示す。

第1表 病斑型を異にする病斑周辺組織の呼吸率と解糖率

	5～4型		4型		4～3型		3型	
	周辺組織	対照	周辺組織	対照	周辺組織	対照	周辺組織	対照
Q_{O_2}	6.10	1.17	5.00	1.45	5.20	1.82	3.51	2.61
$Q^{N_2}_{CO_2}$	0.63	0.64	1.60	1.30	2.40	1.33	2.65	2.04
$Q^{air*}_{CO_2}/Q^{N_2}_{CO_2}$	8.2	1.6	2.6	1.0	1.8	1.2	1.1	1.1

註：* 空気中でのRQを0.85として算出したQ_{CO_2}を示す

表で見る如く病斑が進行型である程呼吸の増加が大きく，5～4型では対照の約5倍に達している。

$Q^{air}_{CO_2}/Q^{N_2}_{CO_2}$ について見ると停滞型の3型病斑では対照と同一の1.1を示しているが進行型ではその値が大きく，5～4型では理論限界値[13, 24]の3を越え8.2に達して居り，パスツール効果の低下している事が推察される。

第2表 感染組織のRQ（5～4型病斑）

	病斑周辺組織	隣接組織*	対照(無接種)
Q_{O_2}	6.50	4.50	3.15
Q_{CO_2}	5.65	3.50	2.50
RQ	0.87	0.78	0.79

註：Q_{CO_2}は直接法により測定，* 周辺組織より0～2.0 cm間の葉組織

次に罹病に伴うRQの変化について見ると，第2表に示す如く感染によつて幾分増加するのが見られるがその程度は余り大きくない。

b. 病斑部よりの距離と呼吸率

罹病による呼吸増加の拡がりを知るため病斑部より距る距離と呼吸について調べた。結果は第3表の如くで病斑部より距ると呼吸の増加率は急激に低下し，6～9 cm 離れた部分ではほぼ正常の呼吸率を保つているのが見られる。

c. 各病斑型の病斑周辺組織の呼吸に及ぼす呼吸阻害剤の影響

植物の呼吸系を調べる場合，各種阻害剤による呼吸阻害の状態を見るのが時として有効な方法となり得る。呼吸系酵素に対する各種阻害剤の影響についてはSlater[12]による詳細な研究があり，宇佐美[26]はこれらの阻害剤による試験から麦の幼植物における呼吸系の変化につき報告している。

イモチ病斑周辺の呼吸が異常に増加している事は先に述べたが，呼吸系の上にも何らかの変化のあろう事が予想される。この点を知るため次の如き実験を行つた。前記の如くして得た病斑周辺組織をさらに幅1 mm以下の細片とし，pH5.8のM/10燐酸緩衝液中に浮遊せしめ，ワールブルグ容器の主室に保つ。側室には所定濃度の阻害剤溶液を入れ，測定0時にこれを主室内に注加する。初めの1時間を除いて次の2時間における O_2 の呼吸量から Q_{O_2} を算出した。結果は第4表の如くである。

第3表 病斑部よりの距離と呼吸率（4型病斑）

	病斑周辺組織	対照	隣接部*	対照	遠隔部**	対照
Q_{O_2}	3.9	2.2	2.6	2.2	2.1	2.1

註：* 周辺組織より0～2.0 cmの部分，** 周辺組織より6～9cmの部分

第4表の結果から見ると，健全葉組織では8オキシキノリシ，サリチールアルドキシムで約30%，アジ化ソーダで約40%の阻害が認められるのに反して，5～4型病斑周辺組織では全く阻害が認められない。

第4表　異る病斑型の病斑周辺組織の呼吸に及ぼす各種阻害剤の影響

阻害剤	5〜4型		4型		3型		健全組織	
	Qo_2	(率)	Qo_2	(率)	Qo_2	(率)	Qo_2	(率)
H_2O	8.7	(100)	5.5	(100)	3.8	(100)	4.0	(100)
8—オキシキノリン	8.8	(101)	5.8	(106)	3.3	(87)	2.9	(72)
サリチルアルドキシム	8.8	(101)	5.7	(104)	3.4	(89)	2.9	(72)
アジ化ソーダ	10.2	(117)	4.3	(78)	2.8	(74)	2.5	(62)
p—ニトロフエノール	11.5	(132)	9.7	(176)	6.0	(158)	5.6	(140)

註：阻害剤は総て最終濃度 10^{-4} Mを使用した。

4型ではアジ化ソーダのみに阻害が認められ，3型では8—オキシキノリン，サリチールアルドキシム，アジ化ソーダ共に阻害を認めるが，その程度は健全の場合よりも低く，病変に伴い呼吸系に大きな変化の起る事が推測される。p—ニトロフェノールでは健，病共に呼吸の増加が認められ，その程度は抵抗反応の起り始める4型病斑の場合に最大であつた。Bonner[2]はp—ニトロフェノールを phenol oxidase 系呼吸の特異的な阻害剤として述べているが，Simon[11]は酵母について2•4ジニトロフェノールと同様に呼吸増加の効果を現わす事を報じている。吾々の得た結果は後者に一致するものと思はれるが，これが uncoupler 効果によるものであるか否かは尚今後の研究にまちたい。

次に病斑周辺組織でのアジ化ソーダによる阻害喪失をさらに確かめるため，アジ化ソーダ添加による呼吸商の変化について見ると第5表の如くで，健全組織ではアジ化ソーダの添加によつて呼吸量が低下し，呼吸商が増加する。即ちアジ化ソーダによつて有気呼吸系における金属酵素が阻害を受け，これに対応して無気呼吸が働き始めた事を意味するものと思われるが，病斑周辺組織では呼吸量，呼吸商商共に大きな変化は見られず，アジ化ソーダに対して全く影響を受けない呼吸系即ちフラビン酵素系が働いているものと思はれる。

第5表　アジ化ソーダ添加による呼吸商の変化

	5〜4型病斑周辺組織		健全組織	
	N_aN_3添加	無添加	N_aN_3添加	無添加
Qo_2	4.85	5.00	1.75	3.30
Qco_2	4.35	4.55	2.45	2.40
RQ	0.89	0.91	1.40	0.73

註：N_aN_3の濃度は最終で 10^{-4} M，RQ値は直接法により測定

次に α−ピコリン酸による呼吸阻害を調べた。α−ピコリン酸は玉利ら[18]によつてイモチ病菌の分泌する毒素の一つとして挙げられ，その作用はキレート化合物生成による金属酵素の阻害として知られている[17]。これらの点から見ると，病斑周辺組織の呼吸酵素に対して何らかの影響をもつことが予想される。結果は第6表の如くで，他の金属酵素阻害剤の場合と類似した傾向が認められるが，その作用は他の阻害剤程大きくない。

次にモノ沃度醋酸による呼吸阻害の状況を調べた。本剤は phosphofructokinase, triosephosphate dehydrogenase を阻害してフラクトース—6—燐酸以下の解糖行程 (Embden–Meyerhof–Parnas 経路の) を阻害する事が知られて居り[4]，本剤の呼吸阻害の程度からこれら以前の呼吸系，即ち Hexose monophosphate shunt 系の呼吸の増減を推察することができる[7]。結果は第7表に示す如くで，病斑周辺組織では阻害率が低下しており，この系の呼吸が増加して来ている事が推測される。玉利ら[19]はピリクラリンの刺戟によつて稲の糖代謝が同系に傾くらしい事を報じている。

第6表　α−ピコリン酸による呼吸阻害

	最終濃度10^{-2} M 添加	無添加	阻害%	最終濃度10^{-2} M 添加	無添加	阻害%
4型病斑周辺組織	5.30	6.65	20%	5.00	5.30	6%
対照（健全組織）	2.20	3.25	33%	2.42	3.35	28%

註：数値は Qo_2 を示す

第7表　モノ沃度醋酸による呼吸阻害

	最終濃度10^{-3} M 添加	無添加	阻害%	最終濃度10^{-4} M 添加	無添加	阻害%
4〜3型病斑周辺組織	4.60	6.60	30%	5.95	6.25	5%
対照（健全組織）	1.98	3.18	38%	3.10	4.00	23%

註：数値は Qo_2 を示す

4. 要約ならびに考察

以上の結果を要約すると次のようになる。(1)イモチ病斑周辺組織では呼吸が増加しており，増加の程度は組織の抵抗力が弱い程大きい，(2)抵抗力が弱い組織の

場合程呼吸率が高まり，その呼吸はパスツール効果を失い，(3)その終末酸化酵素としては金属酵素に代つてフラビン酵素が主導的となる，(4) G-6-P の酸化的通路による呼吸の割合が増加している。

このような現象は Sempio[10] の小麦ウドンコ病，鈴木，富沢，豊田[15] 及び鈴木，豊田[14] の甘藷紫紋羽病に関する研究成績と極めてよく一致している。要するに，感染組織の呼吸増加と抵抗するために必要なエネルギーを供給する目的としてみるとチトクローム系による呼吸が最も能率的であり，銅酵素系（アスコルビン酸オキシダーゼ系），フラビン酵素系と移行するにしたがつてその能率が低下して行くものといえよう。

呼吸増加の原因については Allen[1] は Johnson[8] の研究を引用し，酸化的燐酸化の低下によるP—受容体の増加がその主因であろうとしている。フラビン酵素による呼吸は少くともチトクローム系列を通らない部分だけはＡＴＰ生産が行われないと考えられるのでチトクローム系による呼吸に比べてそれだけＡＴＰ生産能率が低下しており，それによつてＡＤＰの増加することは想像できる。このようなことが感受性組織における呼吸の異常増加の原因ではなかろうか。逆に抵抗力の強い組織では呼吸率が 1.5—2.0 倍までしか増していない点から，金属酵素による呼吸が持続している間は抵抗するために必要なエネルギーの供給はこの範囲の呼吸増加で十分まかなえるといえよう。この点も甘藷紫紋羽病[15] の場合とよく一致している。

金属酵素の活性が感染の進行に伴つて失われる原因については，病原菌の産生する毒素（α-ピコリン酸，ピリクラリン，玉利ら[17,20]）の作用が考えられる。しかしながら Gäumann 一派[9,27] はフザリン酸が単に鉄，銅とキレート結合するだけでなく，原形質の凝固，透過性の増加をも起すことを指摘しており，他方チトクローム系を含む Cyclophorasis が構造に結合していることも知られている (Green[6]) ので，原形質の変質によるチトクロームオキシダーゼの失活ということも当然考慮しなくてはならない。銅酵素は原形質の可溶性部分で働くといわれるが，原形質の変質まで到達すれば必ずしも安全とはいえないであろう。この点は今後の研究に譲ることとしたい。

$Q_{CO_2}^{air}/Q_{CO_2}^{N_2}$ 値は無酸素下のアルコール醗酵に比べて酸素呼吸でどれだけピルビン酸の消費が節約されるかを示すにすぎない。呼吸により糖の消費が節約され，一定の糖消費量に対する生長量が増加することはパスツール効果として知られその原因については色々な説がなされている[5,24]。しかし，呼吸により生産量が増し，ＴＣＡ回路からのアミノ酸，蛋白の合成が容易になることが主な原因であると見て大過はないであろう。ここで，たとえ呼吸が行われる場合でもそれがＡＴＰ生産能率の低いものであれば当然糖の節約は起り得ない。

抵抗力の弱い組織における呼吸の異常増加とパスツール効果の低下は瓜谷[25] のいうような uncoupler 的物質の作用に帰するより，著者らは上述のような終末酸化酵素が感染に伴い金属酵素よりフラビン酵素に移行することに基因するものと思う。

感染に伴いブドウ糖燐酸の酸化的通路による酸化が増加することは甘藷紫紋羽病[14]，ベニバナの銹病[3] について見られており，イモチ病斑についても同様で，おそらく組織褐変の原因物質であるポリフェノールの増加と関連をもつものと思はれる。

以上により感染組織でフラビン酵素が呼吸の終末酵素として活性化されることを知り得たので，今後これによつて生ずる H_2O_2 とパーオキシダーゼ，これらと関連をもつ代謝系についての研究を進めるつもりである。(1957年11月 9 日受理)

引用文献

1) Allen, P. J. :Phytopath., 43 : 221～229. (1953).
2) Bonner, J. : Plant Biochemistry. New York. (1950). P201.
3) Daly, J. M. & Sayre, R. M. :Phytopath., 47 : 163～168. (1957).
4) Dickens, F. : 3 éme congres international de biochimie Rapports, P.126～135. (1955).
5) ———— : The Enzymes. vol.2. (1952). P. 624～683.
6) Green,D.E. : 生化学, 29 (2) :1～7. (1957).
7) 本田幸一郎・小田圭昭・山口健郎 :第30回日生化総会シンポジウム : 28 (1957).
8) Johnson,M.J. : Seience., 200～202. (1941).
9) Linskens, H. F. : Phytophath.Z., 89～106. (1955).
10) Sempio,C. : Phytopath., 40 :1～23. (1950).
11) Simon, E.W. :J. exper. Bot., 4 :377. (1953).
12) Slater,E.C. : Bioch. J., 45 :8～13., 14～30. (1949). ibid., 46 :484～499., 499～503. (1950).
13) 鈴木直治 :農業技術, 10 (11) :1～6. (1955).
14) ————・豊田栄 : 農研報告, C-8. (印刷中).
15) ————・富沢長次郎・豊田栄 : 日植病報, 21

(4) :175～180. (1956).
16) 高橋喜夫：山形大学紀要，2 (2)：37～44. (1956).
17) 玉利勤治郎・加治順：日農化誌，26 :298～303, 345～349. (1952).
18) ———・———：日農化誌，28 :254. (1954).
19) ———・———：日農化誌，31 :538～544. (1957).
20) ———・———：日農化誌，31 :383～387. (1957).
21) 豊田　栄・鈴木直治：日植病報，17 :1～4. (1952)
22) ———・———：日植病報，18 :76. (1953).
23) ———・土居養二・後藤和夫：日植病報，18：162. (1954).
24) Turner, J.S. : Ann. Rev. Plant. Physiol., 2 :145～168. (1951).
25) 瓜谷郁三・赤沢堯・瓜谷美代子：Nature, 174：1060. (1954).
26) 宇佐美正一郎：自然，9 (11)：46～53. (1954).
27) Zähner, H., : Phytopath.Z., 23 : 49～88. (1955).

Summary

This paper deals with the changes in the respiration of leaf tissues infected by *Piricularia oryzae*. Rice varieties, Aiti-asahi (susceptible) and Kanto 53 (resistant) were used. Leaf lesions occurring on these varieties were classified into 5 types as shown diagramatically in Fig. 1. Lesions of the types 3, 4 and 5 were used for the experiments. Types 4 and 5 represent the lesions on the susceptible variety and type 3 represents the lesion on the resistant variety. From each lesion, the central necrotic area is removed and a marginal zone of about 3 mm width was taken as the material for measurement of the respiration rate.

If the tissue is resistant, the respiration is stimulated to some extent, not exeeding over two times as that of non-infected tissue, while if the tissue is susceptible, the respiration is stimulated up to 4 to 5 times. The RQ gives usually 0.8 in the healthy, and 0.9 in the infected tissues.

The diminution of Pasteur effect (shown by $Q^{air}_{CO_2}/Q^{N_2}_{CO_2}$) is remarkeble in the susceptible tissue, but in the resistant tissue it is not affected.

The respiration of resistant tissue is inhibited by 10-25 per cent by such metal enzyme inhibitors as NaN_3, 8-hydroxyquinoline, and salicylaldoxime, while, that of susceptible tissue is not affected, suggesting that flavoprotein enzyme works as terminal oxidase in the infected tissue, in place of metal protein enzymes.

The above mentioned change of terminal oxidase system in the infected tissue is probable because it is already known that *P. oryzae* produces two toxins, α-picolinic acid and piricularin and that these are inhibitory to metal enzymes (Tamari et al.[17-20]).

The writers consider that the main cause of unusual stimulation of respiration and the diminution of Pasteur effect in susceptible tissue is the change of terminal oxidase, from metal protein to flavoprotein.

(Nat. Inst. Agr. Sci.)

文　献　紹　介

くろさび病及びうどんこ病の感染をうけた小麦の呼吸

Farkas, G. L. and Király, Z. : Studies on the Respiration of Wheat Infected with Stem Rust and Powdery Mildew. Physiologia Plantarum, 8 : 877—887. (1955).

罹病性品種の小麦幼植物にくろさび病菌及びうどんこ病菌を接種して罹病に伴う呼吸率の変化を調べると，前者では健全葉の3倍，後者では約2倍の呼吸率増加が認められるが，機械的に傷害を与えた場合には6%の増加に過ぎない。この場合罹病葉では菌自身の呼吸も同時に測定されるがその比率は極めて少ないものと考えられる。種々の呼吸阻害剤を葉組織に真空滲透させて阻害効果を見ると，10^{-3}M沃度酢酸では66%，10^{-2}MNaFで約40%，10^{-3}MNaN_3では約85%の阻害を示し，その程度は健全葉，くろさび罹病葉共に大差なく，解糖系，終末酸化酵素系には大きな変化はないものと思われる。ただし10^{-3}MのKCNでは，罹病葉が36%の阻害を示したのに反して，健全葉では全く阻害が認められなかつた。次に10^{-2}Mマロン酸による阻害を見ると健全葉では70%阻害されるのに比して，くろさび病葉では，35%，うどんこ病葉では40%の阻害に止まり，malachite green による阻害も罹病葉で低下している点から，罹病に伴い解糖系と終末酸化酵素系の間に働くTCA回路に大きな変化の起ることが推察される。以上に示した呼吸の変化は菌の代謝する毒素に起因するものと思われるが，その分離には成功しなかつた。(豊田栄)

秋落稲の胡麻葉枯病罹病性に関する研究

第6報　病態稲の2，3生理学的観察（その1）

浅　田　泰　次*

Yasuji Asada: Studies on the susceptibility of Akiochi (autumn-decline) rice plants to *Helminthosporium* blight. (VI). Some physiological observations on the diseased rice plant affected with *Cochliobolus miyabeanus*. (Part 1).

1　緒　　言

筆者は[5,7]稲胡麻葉枯病菌の殺生作用は稲熱病菌の如き特殊な毒素によるものでなく，cellulase, xylanase, pectic enzyme の如き酵素作用が主であり，秋落稲体内では正常稲におけるよりこれら酵素の分泌が多いのではないかと考えてきた。従つて罹病性或は抵抗性を支配する一つの原因には，これらの酵素の不活性化か不作用化に求めることができえようがこれにはたとへ菌が酵素を分泌しても作用すべき基質が変質しているか，菌が酵素を分泌し得なくなるか或は両者の合同作用かが考えられる。本報はそのいずれかを知るための実験とその他2,3の観察結果について述べる。

研究に当り種々御指導御鞭撻を頂いている京都大学赤井重恭教授，本学吉井啓教授，実験に多大の援助を頂いた当研究室木曾晧，徳永省三，加田隆稔，田辺昇，坂本亘の諸君に厚く御礼申上げたい。

2.　病斑に対する病原菌並びに培養沪液の作用

供試稲は常法[4]により水耕，秋落稲は既報[4]の如くにして育成した。供試菌は研究室保存 H-1 号株である。正常稲秋落稲共接種後6日目の病斑部をパンチで各区 50 個宛切り取り 100°C 下で一定重になるまで乾燥後秤量し，千倍昇汞水で表面殺菌して本菌用培地[3]に加え，病原菌を移植して 28°C 下 20 日培養後，各区の健，病葉を取出し乾燥秤量して重量変化を調べた。結果は第1表の通りである。

Table 1. Weight of healthy and affected rice leaves before and after inoculation. (unit, mg)

Host plant	Normal leaves		Akiochi leaves	
	Healthy	Affected	Healthy	Affected
Weight before inoculation	31	27	31	29
Weight after 20days cultured	24	25	24	23
Difference	7	2	7	6

即ち正常稲についてみると健全葉は罹病葉に比べて最初の重量は大であるが培養処理による重量減少が大であり，菌の酵素作用によつて葉組織が分解されるものと思われるが，罹病葉の減少が少いのは体内成分が不溶性の形に変化しているためではないかと考えられる。これに反し秋落稲では健全葉と罹病葉間の重量減少差が少く病斑部近辺でも健全部と同様に菌の攻撃を受け抵抗の体制ができていないことを示している。即ち病斑の小さい正常稲では病斑部近辺組織は既に菌の作用を受けない状態に変質しているが，病斑拡大の著しい秋落稲ではそのような変化を起さず，健全組織はさらに分解を受け重量減少が起ると推定される。しかしここで問題にすべきは病斑部近辺の成分が不溶性に変質しているだけで，それが菌の酵素作用に無関係だとすれば培地に菌を接種しなくても重量減少は少いはずである。又供試葉は予め乾燥してあるため，でき得れば生材料で行いたい。そこで菌の栄養源として大切な窒素を指標として処理前後の葉内窒素の増減を観察した。即ち酵素の活性が最も著しい培養10日後の沪液[5]に前試験と同様正常稲及び秋落稲の健全葉及び罹病葉を入れ，真空浸透法で液内に沈下せしめ雑菌の混染をさけるためtolueneを加え 10 日後沪液内の窒素を Micro-Kjeldahl 法で定量し最初の窒素量との差を比較した。さらに前述の如く酵素の作用がない時の変化を知るため沪液を100°C下30分加熱して失活させたものを同様に処理し定量した。結果は第2表の通りで，酵素が存在する場合には各区共沪液内

* 愛媛大学農学部植物病理学研究室

Table 2. Nitrogen content in culture filtrate before and after addition of healthy and affected rice leaves. (unit, mg)

Enzyme	Treatment	Normal leaves Healthy	Normal leaves Affected	Akiochi leaves Healthy	Akiochi leaves Affected
Present	Before	0.801			
	After	0.891	0.848	0.900	0.883
	Difference	+ 0.090	+ 0.047	+ 0.099	+ 0.082
Absent	Before	0.983			
	After	0.640	0.796	0.675	0.952
	Difference	− 0.343	− 0.187	− 0.308	− 0.031

に窒素の溶出が起るが沪液を熱処理したものでは反対に葉組織が窒素を吸収する。これで酵素作用によつて始めて組織の分解が行われ単なる溶媒の存在による浸出ではないことがわかる。一方酵素の存在する場合では正常稲の罹病部は健全部に比べて窒素の溶出少く秋落稲の罹病部は健全部との差が少い。これは正常稲の罹病部では窒素化合物が不溶性になつており，これには病原菌の分泌した酵素が作用せず反対に秋落稲の罹病部では不溶性にならず健全部と同様に窒素の溶出が起るのではないかと考えられる。酵素が存在しない場合には当然葉は殺生を受けず培地より窒素その他の養分を吸収しておりそのため培地の窒素減少が起るものと考えられる。罹病葉でその吸収が少いのは壊死組織が多いためであり秋落稲の罹病葉で吸収がより少いのは壊死組織が多いためと思われる。

3. 感染に伴う thiamine の減少

本菌はその発育に thiamine(B_1)を必須とするが[3]，寄主体内における B_1 の多少は当然菌の発育に影響し発育が不充分だとそれだけ酵素の分泌が少く殺生が行われ難いと思われる。又感染によつて増加する polyphenol やその quinoid 型は B_1 を破壊する可能性がありさらに carboxylase の素材である B_1 は呼吸増加と密接な関係を持つている。そこでこのような B_1 が感染に伴つてどう変化するか正常稲と秋落稲でどのような違いがあるかを調べた。供試稲は前節同様で接種後2，4，6日目の葉内 B_1 量を桜井氏法[17]で測定し別に試料に一定の B_1 液を加えて磨砕し，その減少をみた。即ち生葉 10g を蒸溜水(D.W.)40ml 或は B_1 液 40ml (10γ を含む) でホモジナイズし 50ml にして diastase 0.5g を加え塩酸 (1：3) で pH4.5 とし toluene 3 ml を加えて攪拌，12時間 40°C に放置後沪過する。これより25ml とり酸性白土 0.2g を加え攪拌後遠沈し稀塩酸で洗滌し，D.W. 4 ml，A液(phenol 1 g を 95% alcohol 200ml に溶解したもの) 4 ml を加え別にB液 (p-aminoacetophenon 0.6g を濃塩酸 9 ml に溶解し D.W. で 100ml にする) 0.2ml，23% $NaNO_2$ 0.2ml，D.W. 10ml，C液 (NaOH 20g，$NaHCO_3$ 23g を D.W. 350ml に溶解したもの) 6 ml を先に加え1分振盪1時間放置後遠沈，70% alcohol 6 ml，xylene 5 ml を加え2分振盪後遠沈し xylene 層を光電比色計で比色した。結果は第3表の如く秋落稲は最初から B_1 が多いが感染に伴つて正常稲と同様に減少する。しかし秋落稲に B_1 が多いからといつて直ちにそれだけ菌の発育が良好になり病斑拡大を結果するとはいえない。即ち本菌は菌体1g 生長するために約 60γ の B_1 を必要とするが[3]，病斑内の菌体は非常に少いから正常稲内の B_1 量でも菌の発育には充分であるかも知れない。所で，B_1 の破壊は正常稲では感染初期に著しく多く秋落稲では少い。これは寄主体内に侵入して足場を作つた菌が次々と健全組織を殺生分解するための酵素の分泌にはそれだけ初期の充分な菌体の発育が必要となりこの時期における寄主体内の B_1 の破壊は菌の発育，ひいては酵素分泌に大きな障害となる。即ち菌侵入前の寄主体内 B_1 量の多少から罹病性を論ずるより感染直後の破壊がより大切な意味を持つものと考えられる。このようなB_1破壊物質は恐らく phenol 系或は quinone 系物質と思われるが，この生成を予想できる phenol oxidase や peroxidase の活性が感染によつて非常に高まつており正常稲では秋落稲より著しい事実がある[8]。秋落稲に最初から B_1 が多いのは正常稲の場合合成された B_1 が TCA 回路のピルヴィン酸の分解触媒である carboxylase の素材となつて次々と利用されて行くのに対し秋落稲では稲自体の生理的衰弱によつて以前に合成された B_1 がそのまま残つているのではないかと考えられる。そして感染による代謝の高揚（呼吸増加）は B_1 利用系の活性化によつてその消耗が行われ同時に polyphenol やその quinoid 型によつて B_1 の破壊が起るものと推定される。このように正常稲の病斑が小さい原因の一つに寄

Table 3. Changes of thiamine content and thiamine-destroyed substance in normal and Akiochi rice leaves accompanied with the infection of *C. miyabeanus*. (unit, γ)

Host plant		Normal leaves				Akiochi leaves			
Days after inoculation		0	2	4	6	0	2	4	6
Thiamine content		4.5	3.0	3.0	3.0	7.5	4.5	3.0	3.0
Thiamine added	Theoritial value	9.5	8.0	8.0	8.0	12.5	9.5	8.0	8.0
	Measured value	9.0	4.5	6.0	6.0	12.0	9.0	6.0	7.0
	Destroyed value	0.5	3.5	2.0	2.0	0.5	0.5	2.0	1.0

主体内における菌の生育因子である B_1 の破壊によつて菌の発育ひいては殺生が不充分になるという仮定が成立しうる。

4. 感染に伴う酸化的燐酸化の変動

罹病稲は正常秋落稲共に呼吸が高まることは既に報告した[6]。しかし呼吸の増大がそれだけＡＴＰの再生を伴つているか否かが問題である。酸化的燐酸化は酸化のエネルギーを活性燐酸結合（～P）のエネルギーとして蓄えるもので呼吸で吸収した酸素とエステル化した燐酸との比が大きいと呼吸による～Pのプールが有効に行われていることになる。この測定は主として動物組織について行われたが，丸尾[15,16]によつて植物での測定法が明かにされた。筆者は正常及び秋落稲を用いて感染後 2, 4, 6日目の酸化的燐酸化を測定した。6 日目で測定が終つているのはこの時期で病斑の拡大がほぼ停止するからである。方法は次の通りである。生葉 5 g を 0.3M NaF 5 ml，0.9 % KCl 25ml，0.07M燐酸緩衝液（pH7.0） 5 ml を加えて冷却下ホモジナイズし遠沈上清を cycrophorase 酵素液とした。ワールブルグ検圧計を用い主室に 0.001M $MgSO_4$ 0·7aq0.2ml，0.3 M 燐酸緩衝液（pH7.0）0.2 ml，0.15M Na-glutaminate 0.2 ml，0.4M glucose 0.2 ml，0.25M KCl 0.3 ml，0.015 M ATP（片山化学社製）0.2ml，5 %hexokinase（市販 yeast より自製[15]）0.2ml，0.2M NaF 0.2ml，D.W. 0.1ml，cycrophorase 酵素液 1 ml を加える。側室には 87.5% トリクロール酢酸(TCA) 0.5ml，副室は 10 % KOH0.5 ml 及び沪紙片。温度 30°C，20，40，60 分後酸素吸収を測定後ＴＣＡを加えて反応を止め10分間氷冷して

Table 4. Changes of oxidative phosphorylation in normal and Akiochi rice leaves accompanied with the infection of *C. miyabeanus*.

Host plant	Normal leaves				Akiochi leaves			
Days after inoculation	0	2	4	6	0	2	4	6
P decreased (γ)	7.0	13.7	24.9	10.6	5.6	6.0	5.8	8.6
O_2 uptake (μl)	14.0	14.2	19.2	19.6	14.0	14.8	18.0	18.0
Ratio	0.5	0.9	1.3	0.5	0.5	0.4	0.3	0.4

蛋白を沈澱させ沪過後沪液を5倍に稀釈し減少した無機燐を Fiske-Sabbarow 法[11]で定量した。即ち験液 0.5ml に 2.5 % ammonium molibdate 0.8ml，F-S 試薬（aminonaphthol sulfonic acid 0.5 g を 15%$NaHSO_3$195 ml に溶解し 20 % Na_2SO_3 5 ml を加える） 0.4 ml を加え D. W. で全量を 10 ml とし 20°C に 10 分保ち光電比色計で比色定量した。結果は第 4 表の通りで 60 分後の測定値を示した。即ち秋落稲は感染によつて呼吸の増大があつてもそれに伴う燐酸エステル化が不充分で呼吸基質が無駄に消費されており，正常稲では反対に燐酸の Turnover が有効である。病斑部近辺における澱粉の蓄積[6]は amylase 阻害による転流阻害と共にこうして生じたＡＴＰによつて glucose-1-P が作られさらに phosphorylaseを介して澱粉が合成されているのではないかと思われる*。こうした燐酸代謝の高揚は核酸代謝さらに蛋白代謝に共軛し前述の病斑部近辺における体内成分の不溶性化に寄与し菌への養分供給の遮断を起すものと考えられ

* 感染によつて一時光合成が高まる。（赤井，田中：植物病害研究，5 (3)：95～104. 1955）

る。又秋落稲の uncoupling は ADP そのものの濃度が低いか或は根から滲透した H_2S が影響しているのではないかと思われる。菌の代謝産物中には秋落稲にだけ特に uncoupler となるものが考えられない。

5. 無酸素下*における病斑の拡大停止

寄主が抵抗するためには酸素吸収の増加が必要であるから無酸素下* では抵抗が無くて病斑拡大が著しいのではないかと考え，接種後 24 時間目の罹病葉を少量の水を加えたツンベルグ管に入れ一方は排気し他は排気せずに 28°C の定温器に入れ病斑拡大度を比較した。排気しない区は 5～6 日後まで病斑拡大が起り葉は黄化するが，排気区は全然病斑拡大がなく葉は緑色を保ち予想と正反対であつた。空中窒素は緑色植物葉の代謝に直接関係しないから排気即ち無酸素下* と考えてよく又無酸素下では抵抗が著しいために病斑が伸びないとは思えない。即ち寄主は醱酵を行い pasteur 効果は阻害されていると考えねばならないからである。これは菌が寄主体内で発育するためには空中の酸素が必須であることを意味しており好気性菌である本菌が嫌気状態で発育しないのはむしろ当然である。稲葉細胞での光合成や呼吸のための CO_2, O_2 の出入は気孔を門戸として細胞間隙を通じて行われる。本菌はこの細胞間隙の O_2 を利用し炭素源，窒素源，微量要素等を殺生した寄主から吸収していると考えられる。

6. 考　　察

稲葉上に飛来した分生胞子は適当な水分の存在によつて発芽し[12]附着器を機動細胞上或は気孔上に形成する[13]。この時までに発芽率，附着器形成率等の差が発芽抵抗となりうるが[19]本病の場合この抵抗はみられない[1,21]。次に穿入糸から恐らく cellulase 等の分泌によつて機動細胞膜を分解貫通し寄主侵入を行うのであろうが，この過程において機動細胞膜の珪質化，クチクラ層や細胞膜の厚さ硬さ等が侵入抵抗として存在する[1,2]。次に葉肉組織の細胞間隙まで菌糸（発芽管）が伸長し殺生を始めるが，細胞相互間を連絡している中葉成分はペクチン分解酵素及び蓚酸に[9,13]よつて加水分解され細胞相互間の連絡が遮断される。髙橋[20]は微針で 1 細胞を物理的に傷つけても周囲の細胞まで変性凝固が起ることをみているが，これは又菌絲の通つた 1 機動細胞の物理的な傷は細胞相互間の動的平衡を破壊し菌絲の直接作用のない附近の組織までも類壊死状態となるものと思われる。こうした変性細胞に菌絲が到達すると cellulase, xylanase によつて細胞膜の一部分解が起つて細胞内容物の菌による吸収利用が起ると推定される。細胞膜の全体的な分解がない証拠には病斑に崩壊部がないことで示される。以上の時期までの菌の行動のためのエネルギーは胞子自体が持つていた養分に依存しているが，ここで吸収された養分は菌が次の細胞を侵すための pectic enzyme や cellulase 等の分泌のエネルギー源となるであろう。秋落稲のように最初から可溶性の窒素や糖が多く蓄積していると[6]菌の酵素分泌はさらに著しくなる可能性がある[7]。スライド上での発芽胞子は寄主侵入及び蔓延時間（1 週間前後）よりずつと長く生存しているから[9]，胞子自体にそれだけの内部エネルギーの存在を仮定して不自然でない。以上が菌側の初期の行動と思われるが，寄主側ではこれに対応して次のような反応が起るのではないかと推定される。初めて菌の攻撃を受けた一細胞の周辺組織が類壊死状態になると附近の細胞から原形質成分の転流を受ける。(例えば Fe[22], P, S[23])。このような転流仕事のエネルギー源として当然呼吸の増加が起り酸化的燐酸化によつてエネルギーの再成が行われている。原形質内容物の供出を行つた細胞では polyphenol の集積が起り[10] thiamine を破壊し酸化還元の平衡が破れ，さらに病斑部より健全部へ脱流した可溶性窒素は不溶性に変る。Fe や P, S 或は Zn[9]が病斑部へ集るにも拘らず病斑部の重さが同面積の健全部より軽いのはかかる窒素の脱流があるためと考えられる。病斑内部の菌糸は皆生存しているから[6]かかる蓄積成分が殺菌的に働くとは考えられない。故に不溶性になつた窒素や糖は菌に利用され難く菌糸はかかる不溶性物質蓄積組織内に封じ込められそのため酵素の新生と分泌がなくなり病斑拡大の停止となり，病斑内の菌糸は栄養生長から生殖生長への切換が行われ次代の分生胞子を葉上に作るべく自己変化するのではないかと思われる。胞子形成の悪い菌系を飢餓状態に置くとき胞子を多く作ること，スライド上の発芽胞子は 6 日後発芽管から 2 次分生胞子を作ること[9]等はこの推定を裏ずける。一部の菌糸はそのまま組織内で越冬すると考えられる[14]。前報[6]で考察した防禦層とはかかる不溶性物質蓄積層を意味し，酵素が作用し得ないと考えるより防禦層による封じ込めによつて酵素の分泌がなくなると考える方が自然かも知れない。何故なら本菌は細胞間隙を伸長するから蓄積成分が細胞

* 排気しただけで少量の酸素は残つている。

間隙にも蓄積するならば酵素が働き得ないという推定も可能であるが，それより窒素や糖の不溶性化は細胞内或は細胞膜セルロースのミセル空間で起つているのではないかと思われるからである。秋落稲の病斑が大きいのは抵抗の質的な違いによるとは考えられず，窒素化合物その他成分の不溶性化が早いか遅いか，多いか少いかという時間的量的差違によると思われる。そしてその様な違いは結局根腐れによる稲自体の不健全さ，栄養失調，体内代謝の分解的方向の促進，uncoupling などがそれを原因しているのではないかと考えられる。

7. 摘 要

本報告は胡麻葉枯病罹病稲の2，3生理学的観察について述べた。

1. 稲胡麻葉枯病菌の培養沪液内に正常及び秋落稲の健全部及び罹病部を入れその重量変化並びに溶出した窒素量を測定すると健全部及び秋落稲罹病部は重量減少，窒素の溶出が大で正常稲の罹病部は少なかつた。即ち正常稲の病斑部近辺では窒素化合物は不溶性になつていると考えられる。

2. 感染に伴う稲葉内 thiamine 量の変化及び thiamine 破壊物質の生成をみると秋落稲は最初から thiamine 量多く，正常稲では感染初期に著しい thiamine の破壊が行われるが，秋落稲では破壊が少い。

3. 正常及び秋落稲共に感染によつて呼吸が増大するが正常稲は呼吸に伴う燐酸の Turnover が有効であり秋落稲では不充分で呼吸基質を無駄に消耗している。

4. 無酸素下では病斑の拡大が全く起らない。

(1957 年 4 月 13 日受理)

引 用 文 献

1) 赤井重恭・浅田泰次：植物病害研究，5:1～14. (1954).
2) 浅田泰次・赤井重恭：日植病報，18：109～112. (1954).
3) 浅田泰次：日植病報，21：68～70. (1956).
4) ―――：植物防疫，10：464～466. (1956).
5) ―――：日植病報，21：191～193. (1956).
6) ―――：同 上，22：103～106. (1957).
7) ―――：植物病害研究投稿中
8) ―――：愛媛大学紀要(農学編)投稿中
9) ―――：未発表
10) Dufrénoy, J. & H.S. Reed：Phytopath., 32：568～579. (1942).
11) Fiske, C.M. & Y. Sabbarow：J. Biol. Chem., 66：375～400. (1925).
12) 逸見武雄・野島友雄：植物病害研究，1：84～89. (1931).
13) 飯田格・古山清・綾正弘：日植病報，15：178. (1951).
14) 伊藤誠哉：北海道農試特別報告，28. (1932).
15) 丸尾文治：標準生化学実験，東京. (1953). p. 403.
16) 丸尾文治・松橋通生：農化，27：215～218. (1953).
17) 永原友郎：食糧分析，東京. (1948). p. 135.
18) 西門義一：大原農研特別報告，4. (1928).
19) 小野小三郎：農学，3：28～34. (1949).
20) 高橋喜夫：栃内，福士両教授還暦記念論文集，245～248. (1955).
21) 達山和紀：植物病害研究，5：67～70. (1955).
22) 達山和紀・山本昌木：日植病報，18：165. (1954).
23) 吉井甫・徳重陽山・野中福次：日植病報，20：10～20. (1955).

Summary

The present paper deals with some physiological observations on the normal and the Akiochi (autumn-decline) rice plants affected with *Cochliobolus miyabeanus*.

1. Healthy and affected leaves of the both plants were immersed in the culture filtrate of *C. miyabeanus*, and the change of their weight and the amount of nitrogen dissolved in media were measured. Healthy leaves of normal plant and affected leaves of Akiochi plant showed the decrease of leaf weight as well as the much amount of soluble nitrogen, but affected leaves of normal plant was not. The nitrogen in diseased part of normal rice plant, therefore, seems to be changed in the insoluble form.

2. Changes of thiamine contents and thiamine-destroyed substances in rice plant accompanied with the infection were observed. Thiamine, which is the essential substance for the growth of *C. miyabeanus*, is much contained in the Akiochi leaves, but in the normal leaves it is remarkably destroyed at the early stage of the infection. There is a little destruction of thiamine in Akiochi rice leaves.

3. Accompanying with the infection, respiration is increased in the both plants. In normal rice leaves the oxidative phosphorylation caused by respiration takes place more effectively, but in Akiochi leaves it is not so effective and substrates of respiration are uselessly consumed.

4. Diseased spot is not enlarged, when it is kept in the oxygen free condition.

(Coll. Agr., Ehime Univ.)

抗稲熱病性抗生物質の検定法に就て

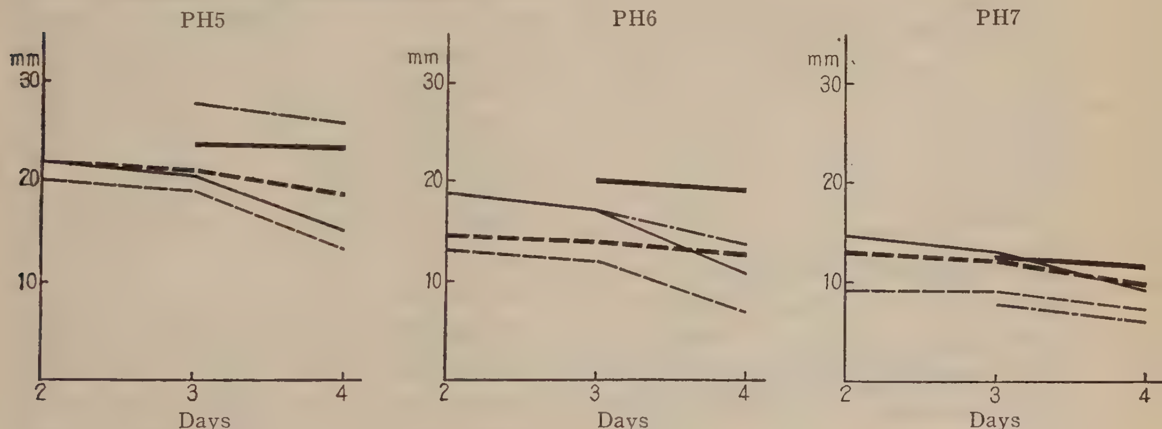
見里朝正・石井至・浅川勝・福永一夫*

Tomomasa MISATO, Itaru ISHII, Masaru ASAKAWA, Kazuo FUKUNAGA: Assay of some antifungal antibiotics using *Piricularia oryzae* as the test organism.

医薬用に使用されている抗細菌性抗生物質の検定法については多くの報告があるが，稲熱病菌等の糸状菌に対して有効な抗黴性抗生物質の検定法に関する研究は少く，しかも大部分の抗黴性抗生物質は被検菌として糸状菌でなく酵母を使用したものが多く[1~5]，被検菌に糸状菌を使用した検定法は少ない[6,7]。

然し抗生物質の作用には特異性があり，稲熱病菌に対する抗菌力が必ずしもそれ以外の菌に対する抗菌力に比例するとは限らない。従つて抗稲熱病性抗生物質の探索の途中で物質がまだ純粋な単一物質になつていない時は被検菌として稲熱病菌を使用せざるを得ない。また稲熱病菌は他の糸状菌・酵母類に比して試験管内で薬剤に対して弱く，低濃度で阻止円が現われるので，植物体中の微量な抗生物質の検出などを行う際の被検菌として適している。例えば抗黴性抗生物質である Antimycin A (以後 Am と略記) は *Torula utilis* を被検菌とした時の測定濃度範囲は 1.0~10 mcg/ml であるが，稲熱病菌を被検菌とした場合は 0.05~1.0 mcg/ml である。

我々は抗稲熱病性抗生物質のスクリーニングを行い，先に Blasticidin[8] (以後 Bc と略記) を得たが，その逐次並びにその応用化に際して上記の理由から稲熱病菌を被検菌とした検定方法を確立する必要にせまられたので，まず従来合成培地上に胞子を作り難いとされていた本菌胞子を多量に得る事のできる培地[9]を発見した後，検定培地の種類・pH・胞子濃度等検定の際に抗菌力に及ぼす諸種の要因について種々検討を行つた[10]結果，本菌を被検菌とした Bc のカップ法による検定方法を確立した。ついで本菌を被検菌とした沪紙円板法により Am, Blastmycin (以後 Bm と略記) 及び Hg 剤の微量定量が可能なことを確めたので，他の抗黴性抗生物質の微量検定にも広く利用され得ると思い報告する。



——————— yeast 0.1 %, starch 1 %, agar 1.5 %
– – – – – – sucrose 2 % and agar 1.5 % in potato juice
—·—·—·— 〃 2 % and agar 1.5 % in rice-plant stem juice
━━━━━ 〃 2.5 %, KH_2PO_4 0.1 %, $NaNO_3$ 0.2 %, KCl 0.05 %, $MgSO_4 7H_2O$ 0.05 %, agar 1.5 %
━ ━ ━ ━ 〃 2.5 %, K_2HPO_4 0.1 %, $NaNO_3$ 0.2 %, KCl 0.05 %, $MgSO_4 7H_2O$ 0.05 %, agar 1.5 %

**The concentration of Blasticidin used is 1.0 mcg/ml.

Fig.1 Influence of composition and pH of assay medium on the diameter of inhibition zone**

* 農林省農業技術研究所

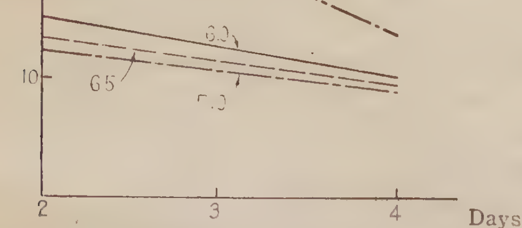
1. Blasticidin の検定法

A. 予備実験

1) 検定培地の組成：一般に抗黴性抗生物質の検定菌として不完全酵母類が使用され糸状菌（黴）が使用されない理由は，糸状菌は細菌・酵母に比較して生育が遅く，阻止円の周辺が明瞭でない為である。検定培地としては被検菌の生育がよく，従つて培養時間が短くて早く測定ができ，しかも薬剤に対して敏感で阻止円が明瞭に大きく現われるようなものがよい。我々は稲熱病菌を検定菌とした時の培地として，稲藁煎汁培地・馬鈴薯煎汁培地・ツァペック培地及び yeast—starch 培地[9]を使用した場合に現われる阻止円の状態を観察した結果，Fig. 1 に示すように稲藁煎汁培地とツァペック（KH_2PO_4）培地は阻止円は大きかつたが生育が遅く従つて測定に時間がかかつたのに反しyeast starch 培地は阻止円が大きく且つ明瞭で最適な事を認めた。

2) 培地の pH：培地 pH の抗菌力に及ぼす影響を調べたところ，Fig. 1 に示すように Bc の抗菌力は pH 5 で最大で，pH 6, 7 となるに従つて順次低下したが培地上の生育は pH 5～7 の間では差異は認められなかつた。従つて検定培地の pH は 5 が適当と思われる。

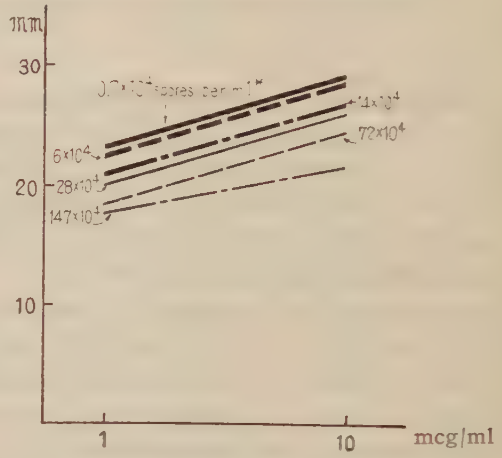
3) 試料溶液のpH：試料溶液に緩衝液を用いてpHを 4.5～7.0 に調節し，pH が抗菌力に及ぼす影響を調べたところ，Fig. 2 に示すように Bc は pH 5 において最高力価を示す事が判つた。



* The concentration of Blasticidin used is 1.0 mcg/ml.

Fig. 2 Influence of pH of sample solutions on the diameter of inhibition zone*.

4) 種層胞子濃度：種層寒天培地中の胞子濃度を 150×10^4spores/ml～1×10^4spores/ml 間の 6 段階とし，胞子濃度による阻止円の変化を調べた。その結果 Fig. 3 に示す如く，胞子濃度によつて阻止円の大きさは著しく左右されるが，Standard-curve はこの胞子濃度の範囲内では胞子濃度に比例して平行に上下する事が判つた。従つてこの濃度範囲内では Standard-curve 法を適用する事ができると思われる。種層添加用の本菌を前培養する yeast-starch 試験管斜面培地は 2 週間培養で試験管 1 本あたり普通約 $30\sim60\times10^5$ 個の胞子を形成して居り，これから後記の方法で平板を作つた場合に検定用培地中に含まれる胞子濃度は，$17\sim34\times10^4$ spores/ml であり，上記濃度範囲内に含まれる。



** Concentration of inoculum is indicated as number of spores of *Piricularia oryzae* per ml in the assay medium.

Fig. 3 Influence of concentration of inoculum on the diameter of inhibition zone. **

B. 本実験

1) 標準 Blasticidin：標準 Bc 粉末（寒天稀釈塗抹法で稲熱病菌発育阻止最小濃度が 0.1mcg/mlのもの）10mg を秤取し，100ml の蒸溜水に溶解して得た 100mcg/ml 溶液を 1 ml 宛試験管に分注し，凍結乾燥後着色デシケーター中に保存する。100 mcg 宛の標準 Bc を含む各試験管は 1 本宛必要日毎に取り出し，pH 5.0 $^{1}/_{10}$ M クエン酸・燐酸 2 曹達緩衝液 10ml に溶解し，その中 1 ml をとり，これに同緩衝液 9 ml を加えて 1 mcg/ml の標準溶液を作る。

2) 試料の調製：試験品を pH 5.0 緩衝液で目的の濃度（推定値）に稀釈する。

3) 種層添加用稲熱病菌：yeast-starch 培地 (可溶性澱粉 1 %，粉末酵母エキス 0.2 %，寒天 1.5 %，蒸溜水) 上に 28° C 2 週間培養した農技研 P.2 菌を使用する。

4) 種層及び基礎用寒天平板培地：可溶性澱粉　10 g，粉末酵母エキス (武田) 1g，寒天　15 g，pH5.0 $^1/_{10}$ M クエン酸・燐酸 2 曹達緩衝液 1000 ml

5) 平板の調製：一定規格 (9 cm) のペトリ皿に上記培地 15 ml 宛を分注する。次に前培養した斜面培地試験管 1 本当りに 3 ml の滅菌水を加えて胞子懸濁液を作り，これを 70 ml の加温溶解した種層用寒天培地に加えてよく混合し，4 ml 宛を 15 ml の基層の上に分注して検定培地を作る。

6) 標準直線法による検定：阻止円 1mm 以下の細かい数字の測定は困難なので，力価は F. D. A [11,12] の計算法によらず，標準直線法によつた。

(標準直線の作成) 標準 Bc 粉末を pH5.0 緩衝液に溶解し，2.0，1.6，1.2，1.0，0.8，0.4 及び 0.24 mcg/ml の稀釈液を調製し，この 7 点についてF.D.A の標準直線設立法に従つて濃度と阻止円の関係を求めた。1 mcg/ml を除き各稀釈液について 3 枚の平板を一組とし，各平板に 4 個のステンレス製円筒 (予研規格) をたて，その中 2 個の円筒に上記の 1 mcg/ml 稀釈液を入れ，残りの円筒には上記稀釈液の 1 つを入れる。従つて 1 mcg/ml 稀釈液については 36 回，他の稀釈液については各々 6 回測定する事になる。28° C に 44〜46 時間培養して阻止円の直径を測定する。各組 3 枚の平板上の 1 mcg/ml 稀釈液の阻止円直径の平均(B)，これに対応する各稀釈液の阻止円直径の平均 (C)，及び 36 個の 1 mcg/ml 稀釈液の阻止円直径の平均 (A) を求める。36 個の 1 mcg/ml 稀釈液の平均値 (A) が各組の 1 mcg/ml 稀釈液の平均値 (B) と相違する時は，その差 (D) を対応する稀釈液の平均値に加減して修正値 (E) を求める。例えば本実験における 0.8mcg/ml の修正値の求め方は次の如くなる。

A＝16.9 (1 mcg/ml の 36 個の阻止円直径の平均)

B＝17.0 (0.8 mcg/ml グループ内の 6 個の 1 mcg/ml の阻止円直径の平均)

C＝16.0 (0.8 mcg/mlの 6 個の阻止円直径の平均)

D＝A－B＝16.9－17.0＝－0.1 (修正量)

E＝C＋D＝16.0－0.1＝15.9 (修正値)

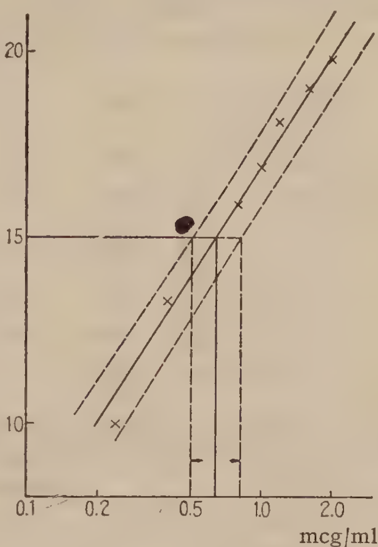
Table I はこの実験結果を示す。この結果から濃度の対数値 (x) と阻止円の直径 (y) との関係を求めると Bc の濃度 0.2〜2 mcg/ml の間で

$$y = 10.46x + 16.9$$

なる直線関係が得られ，此の直線を使用して力価を測定する際の誤差 (95% 信頼限界) は Fig.4 に示す通りである。次に日を改めて同様の方法により標準直線を求めたところ，

$$y=10.39x+17.0$$

なる直線が得られた。



——: Regression Line
……: 95% confidence band
Fig 4　Standard log dose-response curve of Blasticidin

両直線の直線性は Table II に示すように著しい有意性を示した。又この両直線の回帰係数の差の有意性を検定すると

$$t=\frac{b_1-b_2}{\sqrt{s^2\left(\frac{1}{Sx_1}+\frac{1}{Sx_2}\right)}}=\frac{10.46-10.39}{\sqrt{23.13\times\frac{2}{6492}}}=0.26$$

註 $s^2=(71.8+159.5)\div10=23.13$　$Sx_1=Sx_2=6492$

となり，両直線は平行とみなす事ができる。従つて Bc は 0.2〜2 mcg/ml の濃度範囲で標準直線法により定量する事が可能である。

(試料の検定) 1 試料につき 3 枚以上の平板を使用し，各平板には標準直線作成の時と同じく 4 個のステンレス製円筒をたて，その中 2 個の円筒に標準 Bc 1 mcg/ml 液を入れ，残りの円筒には試料の推定 1mcg/ml 稀釈液を入れる。28° C，44〜48 時間培養後，試料の阻止円直径の平均値と標準 Bc 1 mcg/ml 液の阻止円直径の平均を求める。この際の標準Bc 1 mcg/ml 液の平均値が，標準直線上の 1 mcg/ml の値より大きいときはその差を標準直線 1 mcg/ml 稀釈液の阻止円直径に加え，小さいときはその差を減じその直径に対する標準直線上の点から試験品の力価を求める。試料の推定 1 mcg/ml 稀釈液の力価が 0.2〜2 mcg/ml よりずれるときは稀釈を新たにして改めて測定する。

Table I. The relation between the concentration of Blasticidin and the diameters of inhibition zones by the F. D. A. Method

Concentration	Standard Solution 1.0 mcg/ml			Average	Difference from Total avg.	Sample Solution Found Value			Average	Corrected value
2.0 mcg/ml	17.0 16.5	16.0 17.5	17.0 16.0	16.7	+0.2	20.0 20.5	19.0 20.0	18.0 20.0	19.6	19.8
1.6	16.0 17.0	16.5 17.5	16.0 16.5	16.6	+0.3	19.0 18.5	19.5 18.0	19.0 18.0	18.7	19.0
1.2	17.0 16.5	16.0 17.0	16.0 16.0	16.4	+0.5	17.5 17.0	17.5 18.0	18.0 18.5	17.6	18.1
0.8	17.0 17.0	17.5 17.0	17.0 16.5	17.0	—0.1	15.5 17.0	16.0 16.0	16.0 16.5	16.0	15.9
0.4	17.0 17.5	16.0 17.0	17.0 18.0	17.1	—0.2	14.0 13.0	14.0 14.0	13.0 13.0	13.5	13.3
0.24	17.0 17.5	18.0 17.5	17.0 18.5	17.6	—0.7	11.0 12.0	10.0 9.0	11.0 11.0	10.7	10.0
	Total average			16.9						

Table II. Analysis of variance in regression

Test No.	Source of Variation	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F
I	Concentration	6	7186.0		
	Regression	1	7114.2	7114.2	494**
	Deviations	5	71.8	14.4	—
	Between Plates	12	545.0	45.4	
II	Concentration	6	7186.0		
	Regression	1	7026.5	7026.5	221**
	Deviations	5	159.5	31.9	—
	Between plates	12	475.0	39.6	

2. Antimycin A と Blastmycin の稲熱病菌による微量定量

稲熱病菌を被検菌とした沪紙円板法による Am 及び Bm の検定を行つた。

検定方法は Bc の定量法と大体同じであるが，異なるのは次の点である。

1) 標準 Am 及び Bm 並びに試料の調製にメタノールを使用する。

2) Am 及び Bm は同濃度の Bc より阻止円が大きいので，標準溶液の濃度は Am は 0.5 mcg/ml, Bm は 0.1 mcg/ml とする。

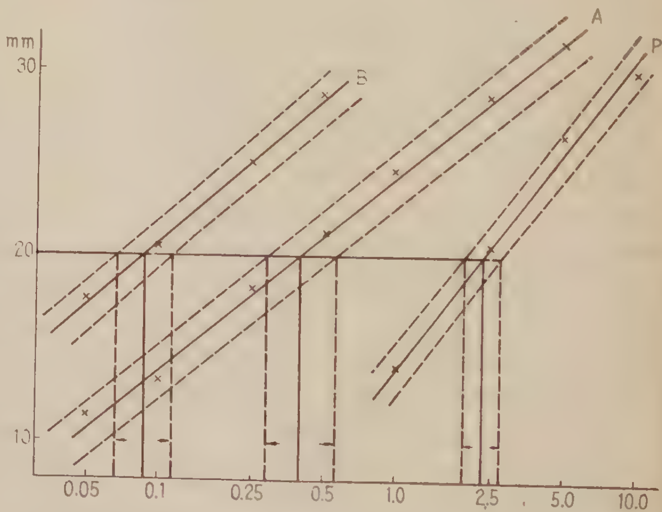
3) 検定用平板培地の調製には蒸溜水を用い無修正でよい。殺菌後の最終 pH は大体 5.6～5.8 である。

4) 検定にはカップの代りに沪紙円板(径 6 mm)を使用し，円板を試料溶液に浸漬してから十分に乾かした後使用する。

その結果は Fig 5 に示すように Am 及び Bm の濃度の対数値と阻止円直径との間には，Am は 0.05～5.0 mcg/ml の濃度範囲内で

$$y=10.37x+24.2$$

なる直線関係が成立し，Bm は 0.05～0.5 mcg/ml の範囲内で



mcg/ml

A : Antimycin A
B : Blastmycin
P : Phenyl mercuric acetate
……: 95% confidence bands

Fig 5 Standard log dose-response curve of Antimycin A, Blastmycin and Phenyl mercuric acetate.

$$y=11.24x+31.8$$

なる直線関係が成立する。

尚参考に本方法によりフェニール醋酸水銀の定量を行つたところ，同じく Fi.g 5 に示すように 1.0〜10.0 mcg/ml の濃度範図内で

$$y=16.6x+14.0$$

なる直線関係が成立し定量が可能であることが判明した。

摘　要

稲熱病菌を被検菌とした抗黴性抗生物質の定量法について検討したところ次の結果を得た。

1) 稲熱病菌（農技研 P.2）を検定菌とした時の検定培地としては yeast-starch 培地がよい。

2) Blasticidin は培地並びに試料のpHともに5.0に於いて最大の抗菌力を示し，また阻止円の大きさは培地中の被検菌の胞子濃度により著しく左右される。最適胞子濃度は 17〜34×10⁴spores/ml である。

3) Blasticidin は濃度0.2〜2.0mcg/ml の間で標準直線法によるカップ検定が可能である。

4) Antimycin A は濃度 0.05〜5.0mcg/ml の範囲で，また Blastmycin は 0.05〜0.5 mcg/ml の濃度範囲で標準直線に基いた沪紙円板法による微量定量が可能である。

本研究を行うに当り，統計処理に関し御助言をいただいた奥野忠一氏並びに実験に御協力下さつた片桐政子氏に対し篤く感謝致します。(1957 年 11 月 28 日)

引 用 文 献

1) Whiffen, A. J. : J. Bact., 56 : 283. (1948).
2) Leben, C. u. G. W. Keitt : Phytopath., 38 : 899. (1948).
3) Dunshee, B. R., et al. : J. Am. Chem. Soc. 71 : 2436. (1949).
4) Ammann, A., et al. : Phytopath., 45 : 559. (1955).
5) Pridham, T. G., et al. : Phytopath., 46 : 575. (1956).
6) 水野民也，他：日植病報, 21 : 85. (1956).
7) Watanabe, K., et al. : J. Antibiotics, Ser. A., 10 : 39. (1957).
8) Fukunaga, K. et al. : Bull. Agri. Chem. Japan, 19 : 181. (1955).
9) 見里朝正，他：農及園, 32 : 797. (1957).
10) 福永一夫，他：日植病報, 22 : 32. (1957).
11) Food u. Drug Administ : Federal Register April, 4. (1947).
12) 厚生省予防局：J. Pen., 1 : 181. (1947)

Summary

(1) *Piricularia oryzae* was used as the most senstive test organism of microassaying some antifungal antibiotics by the cup or the paper disc method. Spores of *P. oryzae* were obtained by cultivating the organism on the yeast starch agar slants at 28°C for 2 weeks. The concentration of spores in the assay medium necessary for optimum results was about 17–34×10⁴ spores per ml (Fig. 3).

(2) A study was made on the factors affecting the Blasticidin assay. The most important factors to be controlled in the assay of Blasticidin were hydrogen ion concentrations of the assay medium and of the sample solutions. As shown in Fig.1 and 2, Blasticidin gave the highest activity against *P. oryzae* at pH 5.0 in both of them.

(3) The cup method for assaying Blasticidin was established. The assay medium was as follows: Soluble starch 10g, yeast extract 1g, agar 15g and 0.1M PO_4 buffer of pH 5.0 1,000 ml. The sample solutions were made with 0.1 M PO_4 buffer of pH 5.0. As shown in Fig 4, the excellence of log dose-response curve and its linearity within the range of 0.2–2.0 mcg/ml warrants the use of the cup method.

(4) The paper disc method was adapted to the assay of Antimycin A and Blastmycin. The assay media were made with distilled water. Samples were dissolved in methanol. The linear relations were found between the diameters of inhibition zones and the log concentrations within the ranges of 0.05–5.0 mcg/ml of Antimycin A and 0.05–0.5 mcg/ml of Blastmycin. The potency are calculated on the basis of this relation.

(Nat. Inst. Agr. Sci.)

植物におけるストレプトマイシンに関する研究

第3報　タバコの生長におよぼすストレプトマイシンの影響

日高　醇*・村野久富*・神山　功**

Zyun HIDAKA, Hisatomi MURANO and Isao KAMIYAMA : Studies on the Streptomycin for Plants. III. Effects of Streptomycin on Plant Growth.

抗生物質を植物の病害の防除に応用する研究と同時に，その植物の生育におよぼす影響についても多くの研究がある。Wilson et al. (1950,1951) は多くの抗生物質の影響を細胞学的に研究し，mitosis に異常が起ることを報告した。De Dekan-Grenson (1955) は，ストレプトマイシンはオオムギの葉の葉緑素の生成のみならず葉緑体の生成を抑制するが，白い葉となつたものでもストレプトマイシンを除くと，正常な状態にもどることを述べている。Barton et al. (1954) はペニシリン，ストレプトマイシン，テラマイシンなどはいずれもコムギの根の生長を増したと述べているが，Norman (1955) はテラマイシンは低い濃度でキウリ，オオムギ，トウモロコシなどの根の生長を抑制したと報告している。また Nickell et al. (1954) はアオウキグサ *Lemna minor* を用いたときペニシリン，バシトラシンは生長を促進し，ストレプトマイシンなどはその濃度，または植物の生長期間の長さによつて生長を増し，または抑制すると述べた。以上のように抗生物質は，植物の生育を促進または抑制することがあるが，抗生物質の種類およびその濃度，あるいは植物の種類，生長時期およびその状態によつて異なると思われる。

著者らはさきにタバコの病害に対するストレプトマイシンの効果について研究結果を報告したが，さらにそのタバコの生長におよぼす影響について研究したので，その結果について報告する。

I. ストレプトマイシンの葉面散布とタバコ苗の生育

実験方法

ストレプトマイシン硫酸塩の 200 mcg/ml の水溶液に Tween 20 を 0.1 % およびグリセリンを 1 %加えて，苗床のタバコの葉の裏面にガラス噴霧器で 7 日おきに，時期および回数をかえて散布し，第 1 表のように 10 区を設けた。タバコの品種はブライトエローで，1 区の苗床面積は約 0.2 坪，約 300 本のタバコを用いた。散布当時のタバコの大きさ，および 1 本当りの散布量は第 2 表の如くである。散布してから 3 日目に各区とも 10 本を無作為にとり，タバコの体内のストレプトマイシンの濃度を，第 1 報に用いた方法によつて検定し，生育状態は葉数，最大葉の長さと幅，草丈(草丈は第 4 回のときにのみ調査した)，生体重および乾燥重を測定した。なお乾燥重は 80°C で 24 時間乾燥後に測定した。

第 1 表　試験区別

試験区別 ＼ 処理時期	第1回 月 日 4，2	第2回 4，9	第3回 4，16	第4回 4，21
A	○	○		
B	○	○	○	
C	○	○	○	○
D	○		○	
E		○	○	
F		○		○
G			○	
H			○	○
I				○
J	無処理			

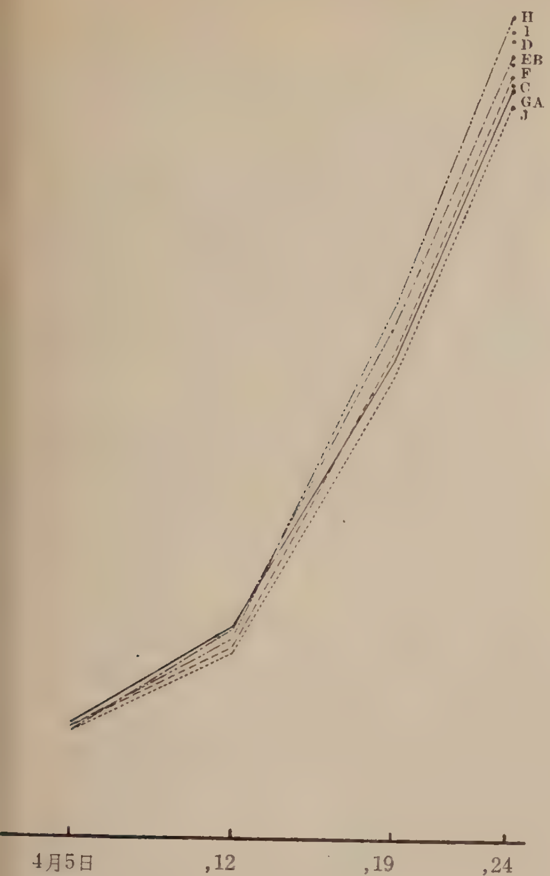
備考：○印は処理したことを示す

第 2 表　ストレプトマイシンの散布量と散布当時のタバコの大きさ

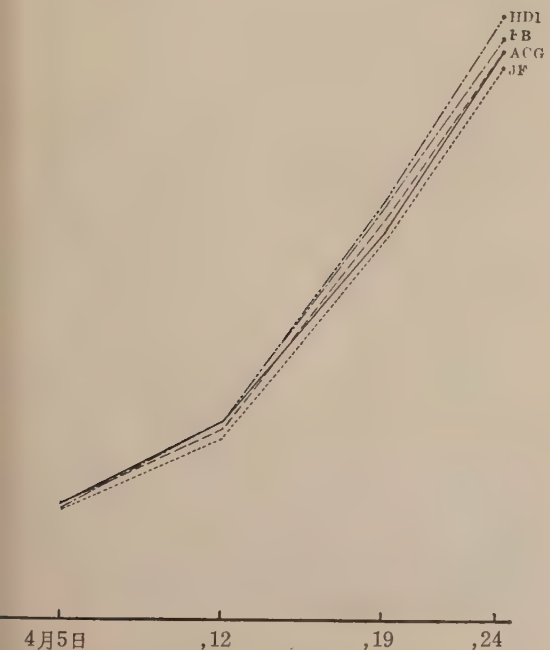
処理時期	種子まき後の日数	葉　数	最大葉の長さ	1 本当りの散布量
4月2日	34日	5～6枚	約 1.5cm	約 1.0ml
4，9	41	7	〃 3.5	〃 1.5
4，16	48	8～9	〃 8.0	〃 4.0
4.21	53	10～11	〃 15.0	〃 6.5

* 秦野たばこ試験場

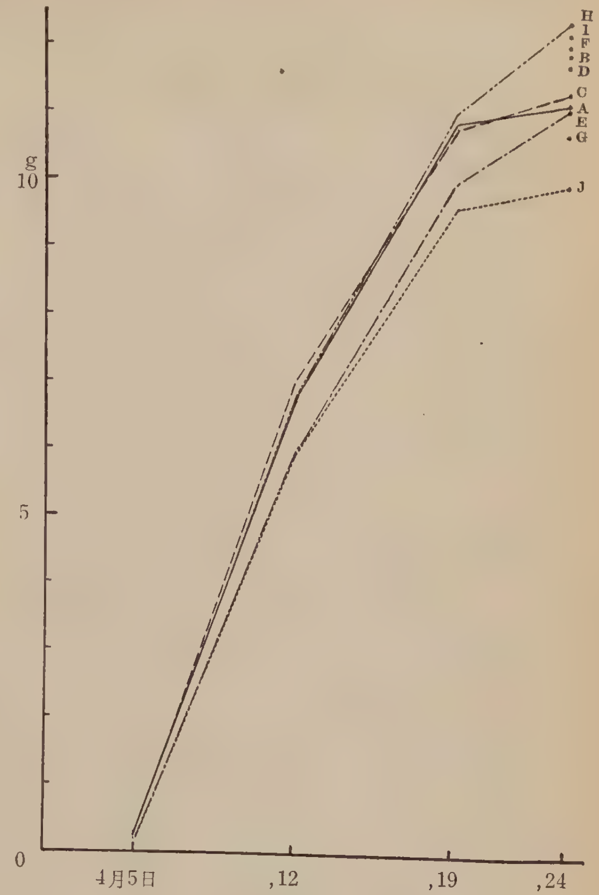
** 日本専売公社郡山地方局



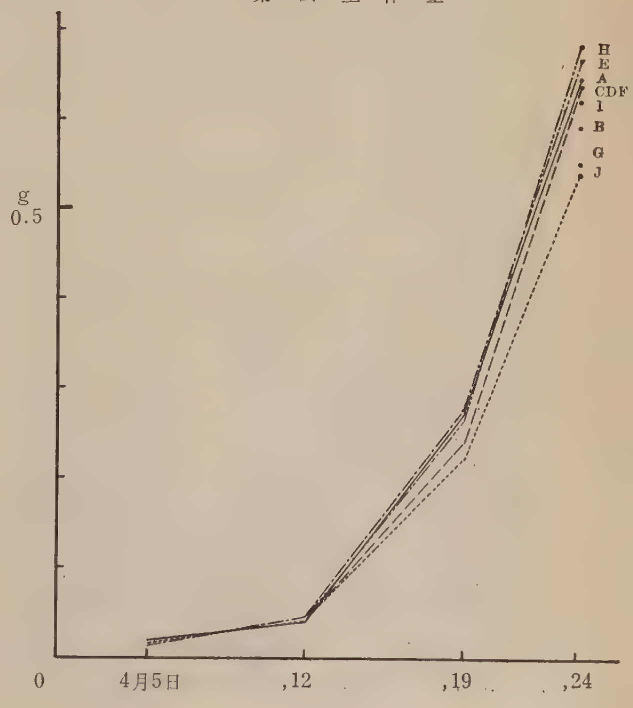
第１図　最大葉の長さ



第２図　最大葉の幅



第３図　生　体　重



第４図　乾　燥　重

実験結果および論議

第1図～第4図，および第3表にストレプトマイシンを散布したタバコの生育状態を表わした。これらの図および表をみると，散布時期および回数についてははつきりした差は認められないが，第1回と第3回との2回散布のD区，第2回と第3回との2回散布のE区，および第3回と第4回との2回散布のH区の生育がすぐれて，連続4回散布したC区はそれらより少し劣つていた。葉数，最大葉の長さおよび幅は散布したものが僅かにすぐれていたが，生体重および乾燥重は散布した最も生育のよかつた区と無散布区とでは生体重で1本当り2g以上，乾燥重で0.1g以上の差がある。この差はストレプトマイシンを散布したタバコの全植物体の生育がすぐれていたことを示している。散

第3表 ストレプトマイシンを散布したタバコの葉数，最大葉の長さ×幅，および草丈

試験区別	葉数				最大葉の長さ×幅				草丈
	4月5日	4,12	4,19	4,24	4,5	4,12	4,19	4,24	4,24
A	6.1枚	7.4枚	10.2枚	11.2枚	4.27	13.68	60.99	141.12	4.05cm
B	6.0	7.7	10.0	11.3	3.76	13.08	68.93	149.60	5.11
C	6.2	7.4	9.9	11.1	4.25	12.14	64.31	143.64	5.23
D	6.1	7.6	10.2	11.5	4.19	12.47	67.71	157.52	4.75
E	6.0	7.4	10.1	11.2	3.83	13.44	70.15	151.36	5.16
F	6.0	7.4	10.2	11.0	4.23	13.18	75.64	142.68	5.72
G	6.2	7.1	9.8	11.1	4.24	12.08	65.49	141.96	4.0
H	6.1	7.3	10.2	11.6	4.08	12.88	73.78	163.76	5.34
I	6.0	7.0	9.7	11.3	3.35	11.48	65.54	159.28	5.1
J	6.0	7.1	9.6	11.0	3.50	10.36	58.24	136.12	4.1

第4表 苗床でストレプトマイシンを散布したタバコの畑における初期の生育

試験区別	草丈	葉数	最大葉		
			長さ	幅	長さ×幅
E	25.7cm	12.7枚	46.9cm	21.3cm	998.9
H	31.7	14.2	48.6	20.9	1015.7
J	20.4	11.5	44.5	20.0	890.0

備考：畑への移植は4月25日に行い，この調査は6月4日に行つた。

布区のタバコは無散布区のものより根群の発達がよく，抱土量も多かつたことを観察した。生育のよかつたE区およびH区と無処理区の苗を，畑に移植後の初期の生育状態を第4表に示した。この表より散布した苗を移植すると，畑における初期の生育もすぐれていることがわかる。とくに苗床期の後半，すなわち第3回と第4回との2回散布したH区は，活着がよく畑の初期の生育がすぐれていた。これは他に原因があるかも知れないが，苗の根の発達がよかつたこともひとつの原因と考えられる。このようにストレプトマイシン硫酸塩200 mcg/mlの水溶液をタバコ苗に散布した場合に，その生育に何ら悪い影響を与えず，むしろ僅かではあるが生長を促進する傾向が認められた。第2報で述べたように700 mcg/ml以上の濃度の水溶液を散布すると，散布後3日目位に黄色の斑点が生ずるか，または葉縁が黄化してくる。これらはひどさにもよるが，しだいに消えてしまう。ひどければ一時的には生育が抑制されるようである。

タバコの体内のストレプトマイシンの検定結果を第5表に示した。この表よりストレプトマイシンは，小さいタバコ苗の葉に吸収されて，それが生育とともにうすめられてはいくが，なおよくタバコの体内に保持されていることが認められる。ストレプトマイシンの濃度が，タバコ野火病や立枯病の防除に使用する程度の濃度と散布回数ならば，タバコの生長を促進する効果があると思われる。

第5表 タバコの体内のストレプトマイシンの検定結果

試験区別		第1回 4月5日	第2回 4,12	第3回 4,19	第4回 4,24
A		1.47cm	1.69cm	1.35cm	1.27cm
B		1.35	1.67	1.54	1.43
C		1.38	1.50	1.54	1.46
D		1.40	1.27	1.56	1.27
E		0	1.37	1.51	1.35
F		0	1.32	1.40	1.31
G		0	0	1.40	1.28
H		0	0	1.37	1.50
I		0	0	0	1.45
J		0	0	0	0
標準ストレプトマイシンよる阻止円	8 mcg/ml	1.65cm	1.76cm	1.68cm	1.68cm
	2 mcg/ml	1.05	1.24	1.15	1.12

備考：表の数字は阻止円の直径を示す。

II. ストレプトマイシンの散布と畑におけるタバコの生育

実験方法

タバコ苗にストレプトマイシンを散布して畑に移植したとき，畑における初期の生育におよぼす影響を検討した。タバコの品種は在来種の松川を用い，ストレプトマイシンの 125 mcg/ml または 250 mcg/ml の水溶液（ヒトマイシンを使用）を小型噴霧器で移植前14日と7日との2回に，それぞれ葉および茎に1本当り約2 ml を散布し，3区をもうけた。また発蕾におよぼす影響をみるためには，苗床で1本当り2 ml を7日おきに2回散布し，畑では第1回を土寄直後1本当り 10ml，第2回はその2週間後に 20ml を葉および茎に散布した。ストレプトマイシンの濃度によつて5区をもうけた。

実験結果および論議

苗床でストレプトマイシンを2回散布したタバコを畑に移植して，畑における初期生育の状態を第6表の1および2に示した。これからみれば，処理区は無処理区にくらべて草丈はほとんど差がないが，幹周や最大葉が大きく，また生体重および乾燥重も多い。また根の抱土の量がはるかに多いことから，根群の発達も良好であることが想像される。ストレプトマイシンの濃度の 125 mcg/ml と 250 mcg/ml との間には，5月22日の調査では最大葉の長さ×幅，乾燥重および抱土重量などに少しの差を認めたが，6月 26 日の調査ではほとんど認められない。

ストレプトマイシンがタバコの発蕾におよぼす影響については第7表に示したように，無処理区にくらべて発蕾が早い傾向がみられる。

苗床でストレプトマイシンを散布したことが畑における生育にまで影響しているが，これは根群の発達が良好なことがひとつの原因であると思われる。タバコの葉に吸収されたストレプトマイシンは他に移動することを認めていない，また茎に吸収されたものは上方にのみ移動することを認めている。しかし生長の促進は局部的ではなく，移動を認めない根部も地上部につれて発達して全体が大きくなつている。これが原因については不明である。畑における初期の生育が良好であれば，タバコでは早作となつて品質をよくし，また立枯病，野火病などの被害を少なくする効果が大きい。

第6表のI　ストレプトマイシン処理とタバコの生育

試験区別	草丈	葉数	最大葉 長さ	最大葉 幅	最大葉 長さ×幅	生体重	乾燥重	抱土重量
125mcg/ml区	8.8cm	12.6枚	16.5cm	7.3cm	120.4	10.44g	0.99g	21.0g
250mcg/ml区	8.1	12.2	16.4	7.5	123.0	10.34	1.05	22.1
無処理区	9.0	12.0	16.3	7.3	118.9	10.08	0.93	17.8

備考：1956年5月22日調査

第6表のII　ストレプトマイシン処理とタバコの生育

試験区別	草丈	幹周	葉数	最大葉 長さ	最大葉 幅	最大葉 長さ×幅
125mcg/ml区	34.0cm	6.3cm	26.2枚	36.8cm	21.2cm	780.1
250mcg/ml区	34.0	6.4	25.4	38.1	20.0	762.0
無処理区	33.5	6.1	26.0	36.1	19.3	696.7

備考：1956年6月28日調査

第7表　ストレプトマイシンがタバコの発蕾におよぼす影響

試験区別	ストレプトマイシンの濃度 苗床	畑 第1回	畑 第2回	供試本数	発蕾本数	百分比
1区	125 mcg/ml	170 mcg/ml	250 mcg/ml	198本	79本	39.9%
2区	125	170	170	148	61	41.2
3区	250	170	170	149	66	44.3
4区	250	250	170	148	52	35.1
5区	無処理			150	38	25.3

備考：側面から見て果房が抽出するときを発蕾とした。

摘要

苗床でタバコにストレプトマイシンを散布して，その苗の生育および畑に移植してからの初期の生育におよぼす影響を検討した。苗床のタバコ苗に 200 mcg/ml のストレプトマイシン硫酸塩の水溶液を7日間隔で1～4回散布して，その後の生育状態を葉数，最大葉の長さおよび幅，全植物体の生体重および乾燥重によつて測定した。ストレプトマイシンを散布したタバコは，無処理区のもの

よりも生育がすぐれていた。苗床で125または250 mcg/mlのストレプトマイシン水溶液を2回散布したタバコ苗を畑に移植したとき，畑における初期生育に良好な結果を示した。なおストレプトマイシン散布によつてタバコの発蕾を早めることも認められた。

(1957年11月1日受理)

引用文献

1) Barton, L. F. and MacNab, J. : Contr. Boyce Thompson Inst., 17 : 419～434. (1954).

2) 日高　醇・村野久富：日植病報，20(4) : 143～147. (1956).

3) 日高　醇・村野久富：日植病報，21(2,3) : 49～53. (1956).

4) Nickell, L. G. and Finlay, A. C. : J. Agric. & Food Chem., 2 : 178～182. (1954).

5) Norman, A. G. : Agron. J., 17 : 585～587. (1955).

6) De Dekan-Grenson, M. : Biochim. Biophys. Acta, 17 : 35～47. (1955).

7) Wilson, G. B. : J. Heredity, 41 : 226～231. (1950).

8) Wilson, G. B. and Bawen, C. C. : J. Heredity, 42 : 251～256. (1951).

Summary

Solutions of streptomycin were sprayed on tobacco seedlings in the seedbed to determine the effect on growth in the seedbed and in the early stages after transplanting into the field.

Tobacco seedlings grown in the seedbed were given 1-4 sprays at intervals of a week with concentrations of 200 mcg/ml streptomycin sulphate. Tobacco growth was estimated by the number of leaves, length and width of the largest leaf and the fresh and dry weight of the whole plant. It was found that when streptomycin was sprayed to tobacco seedlings a favourable effect was exhibited in the growth of the whole plant.

Tobacco seedlings grown in the seedbed were given two sprays at intervals of a week with concentrations of 125 and 250 mcg/ml of streptomycin chloride respectively and transplanted into the field. The plants showed a favourable growth in the early stages after the transplanting which appeared to be due to excellent root development.

It was observed that tobacco plants sprayed with streptomycin formed flower buds earlier than the untreated plants.

(Hatano Tobacco Experiment Station)

文献紹介

R. H. Daines, R. J. Lukens, E. Brennan. and I. A. Leone : Phytotoxicity of Captan as influenced by formulation, environment, and plant factors. Phytopath., 47 (9) 567～572. (1957).

Captan [N—(trichloromethylthio)—4—cyclohexene—1.2—dicarboximide] は米国では種々の果樹病害防除面の卓効だけでなくリンゴの仕上がりにもよい結果を与えるので広く用いられているが，時として薬害を生じ葉に小さな円い斑点を作る。そこで薬害に関与する諸々の因子について実験を試みた。実験には主として温室に栽培したインゲンの葉を用いた。

(1) Captan の濃度，増量剤，及び展着剤。0.25～8% まで濃度をかえて試験すると濃度の増すのにつれて薬害も増加し，増量剤に Kaolinite を用いると薬害は最多で talc の時には最も少い。展着剤 Igepal CA を 0～4％混入すると溶液の表面張力が減少し薬害は増加した。(2) 薬剤軽減剤として5種の物質を添加してみたところ MgO, $CaCO_3$ は効果があつた。(3) 温度と光線，20～37°C の範囲で試験したが 30°C 附近から急に薬害が増加し，一般に高温，乾燥でひどかつた。

なお Captan 剤が気孔から侵入していき易い散布条件を与えると薬害が著しいことを観察した。Captan は普通の温度では比較的安定だが，高温やアルカリの作用をうけ易く，分解して HCl や H_2S を出す。そして Captan の薬害作用はこの decompose に由来する H^+ によると想像した。

(寺中理明)

2,4-Dならびに類似フェノキシ化合物添加培地における数種菌類菌叢の形態的特性

内藤中人・小島義之*

Nakato NAITO and Yoshiyuki KOJIMA: The morphological characteristics of the colonies of several fungi on agar media containing 2,4-D and related phenoxy compounds.

菌類の人工培地における生長型は，栄養源が豊富であれば，ほぼ一定の生長速度を示す"non-staling"型と，栄養源は豊富であるにもかかわらず，培養経過とともに生長速度がしだいに低下する"staling"型とに，ふつう大別されている。このように菌類の生長型は，主として，培養中における生長速度の動向にもとずいて類別されているのであるが，菌叢の外観からも両型を区別できることが，若干の菌について報告されている。例えば，Brown[1,2]は *Fusarium fructigenum* その他の *Fusarium* 属菌，また Hawker[5]は *Sordaria* sp. において，菌叢周縁部にあらわれる不規則な波状形態をも，"staling" 型の1特性にとりあげている。このような生長相の類別は，主として常用の正常培地における実験結果に立脚するものであるが，筆者ら[6,7,10,11]は，菌類の発育を阻害するような薬剤を添加した培地でも，やはりこの両型に大別されることを報告した。一方また，2,4-D あるいは類似フェノキシ化合物添加培地において菌叢周縁部が波状形態を呈する事実には，筆者らも従前から注目しており，既報[6]でもふれておいたところである。そこで，Brown らが主張しているとおり，波状菌叢が果たして"staling"型の1 特性であるかどうかを究明するため，本実験をおこなつた。なお，本報の大要は昭和 32 年度関西部会で講演した。

実験材料ならびに方法

オリーブ炭疽病菌(*Gloeosporium olivarum* Alm.)，柿炭疽病菌 (*Gloeosporium kaki* Hori)，スエヒロタケ (*Schizophyllum commune* Fr.)，および稲胡麻葉枯病菌 (*Cochliobolus miyabeanus* Drechsler) の4菌を供試した。供試薬剤は，sodium 2,4-dichlorophenoxyacetate (2,4-D)，2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T)，2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid (MCP)，2-chlorophenoxyacetic acid (CPA)，2-methylphenoxyacetic acid (MPA)，2-methylphenol (MP)，2-chlorophenol (CP)，2,4-dichlorophenol (DCP)，potassium α-naphthaleneacetate (NAK)，および硫酸銅である (2,4-D のみは市販品)。オリーブ炭疽病菌においては，各種濃度の供試薬剤添加培地に 25°-28°C で 6-13 日間培養して，その菌叢形態を標準無添加培地のものと比較し，他の3菌では，2,4-D のみについて同様の実験をおこなつた。第2，第3表にかかげた以外の供試濃度はつぎのとおりである。MP 0.04，0.03，0.02，0.01；CP 0.02，0.01，0.008，0.005；DCP 0.008，0.006，0.003，0.001；NAK 0.04，0.03，0.02，0.01；硫酸銅 0.3，0.2，0.1，0.04 %。基本培地の処方は，ペプトン 10 g，KH_2PO_4 1 g，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4 g，蔗糖 50 g，蒸溜水 1 l である。

実験結果

1. 各種薬剤添加培地におけるオリーブ炭疽病菌菌叢周縁部の形態

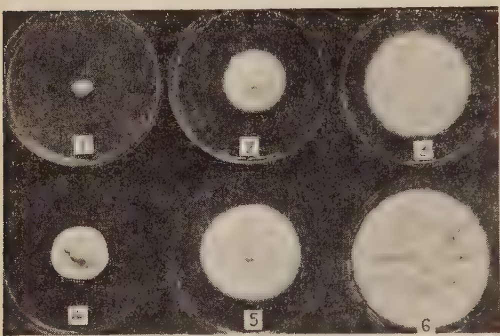
各種濃度の供試薬剤添加培地におけるオリーブ炭疽病菌菌叢の形態について，観察結果を総括してみると，2,4-D，2,4,5-T，MCP，CPA，あるいはMPA のフェノキシ化合物を添加した場合には，ほとんどの濃度において，菌叢周縁部に不規則な波状形態があらわれたのに対し，他の薬剤では，標準無添加区とおなじく，ほぼ円形であつた(第1，第2図参照)。しかし，このような波状形態のなかには，saltation に類似した様相のものも若干みられたし，既報[8]において，2,4-D は柿葉枯病菌 (*Pestalotia diospyri* Syd.) の saltation を誘致することがわかつているから，この点について多少危惧の念をいだいた。したがつて，多

---
* 香川大学農学部植物病学研究室

数の波状部から正常培地に移植してみたが，その菌叢外観，生長速度などは母菌とまつたく同一であつたの



第1図　各種濃度フェノキシ化合物添加培地における4種供試菌の各種波状菌叢



第2図　薬剤を培地に添加しても波状形態のあらわれないオリーブ炭疽病菌菌叢
1. 0.04% MP　2. 0.03%MP　3. 0.02%MP
4. 0.04%NAK　5. 0.01%NAK　6. 標準無添加
(25°C で NAK は 8 日，MP は 11 日培養)

第1表　各種薬剤添加寒天培地におけるオリーブ炭疽病菌菌叢形態の比較

薬剤		波状菌叢の有無 §	培養経過に伴う生長速度の低下	抗菌物質の生成
フェノキシ化合物	2,4-D	+	+	+
	2,4,5-T	+	+	+
	MCP	+	+	+
	CPA	+	+	+
	MPA	+	+	+
フェノール化合物	MP	—	—	—
	CP	—	—	—
	DCP	—	—	—
	NAK	—	—	—
	硫酸銅	—	—	—
	標準無添加	—	—	—

§ ＋はほとんどの供試濃度にあらわれ，－はすべての濃度にあらわれないもの

で，本現象が saltation によるとは考えられない。なお，波状菌叢のあらわれた薬剤は，その添加培地における本菌生長速度が "staling" 型のもののみで[6,7,10)]，且つ該培養沪液からは，"staling" の主因をなすと思われる抗菌物質が分離されている[6,9,10)]。一方，波状菌叢のみられなかつた薬剤は，いずれもその添加培地における生長速度が "non-staling" 型で[6,7,10)]，該培養沪液中における抗菌物質生成も否定されている[6,10)]。これらの関係を表示すると，第1表のとおりである。しかし波状形態のみられるものでも，波状の程度は，薬剤の種類，添加濃度，また菌の種類（後述）によつてかなり相違がある。第1図に示したものは，それらの代表的形態である。つぎに波状の程度と添加濃度との関係を，生長速度の動向に関する既報[6,7,10)]の結果と比較対照してみると，第2表のとおりである。ただし両者の供試濃度には，不同のものも若干あるから，これを厳密な比較の資とするには多少の疑義もあろうが，それにもかかわらず，生長速度低下，波状形態のそれぞれの程度と添加濃度との関係がほぼ平行していることは，第2表から充分察知できると思考

第2表　オリーブ炭疽病菌菌叢の波状形態と薬剤添加濃度との関係

薬剤	濃度 (%)	波状の程度	培養経過に伴う生長速度の低下
2,4-D	0.3	+	±
	0.06	+++	+++
	0.02	++	++
	0.015	+	+
2,4,5-T	0.02	+	++
	0.01	+	+++
	0.005	+	+++ (0.004)
	0.003	+	±
MCP	0.03	++	+++
	0.02	++	+++
	0.015	+	+
	0.01	+	± (0.008)
CPA	0.17	+	± (0.2)
	0.1	++	+++
	0.05	+	±
	0.03	±	—
MPA	0.15	+	++ (0.17)
	0.1	++	++ (0.12)
	0.05	±	±
	0.03	—	—

(註)　生長速度に関する既報[6,7,10)]濃度中，本実験と異なるものは(　)内にその濃度を示した。

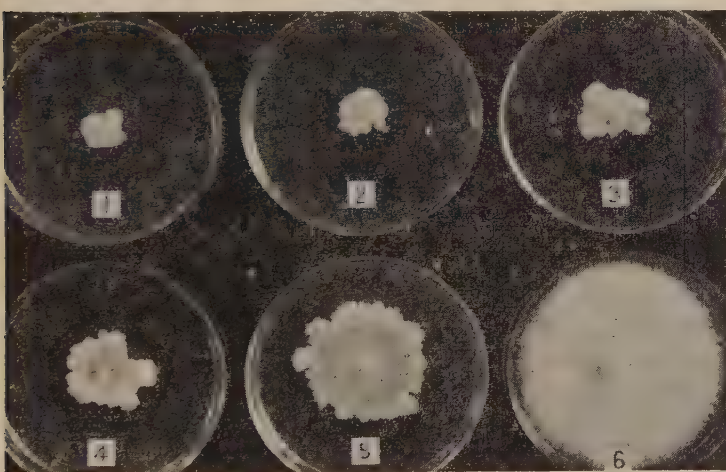
する。そして多くの場合，発育しうる最高限度濃度と抑制のあらわれる最低限界濃度とのほぼ中間の濃度（7日後の菌叢直径が標準区の約 $^1/_2$—$^1/_3$ 程度）のとき，波状の程度はいちじるしいが，MPAではこれが，最高限界濃度のほうに多少ずれていた。したがつてこの種の実験には，菌の発育が各種段階となるよう濃度を調整する必要があるといえよう。本報でも，ほぼこの趣旨にそう濃度を予備実験により選定した。

2. 2,4-D 添加培地における3菌菌叢周縁部の形態

柿炭疽病菌，スエヒロタケ，および稲胡麻葉枯病菌を 2,4-D 添加培養した結果によると[11]，前2菌の生長速度は "staling" 型で，且つ，該培養沪液中における抗菌物質生成が確認されているに対し，稲胡麻葉枯病菌のみは "non-staling" 型の生長速度を示し，抗菌物質も生成しないことが判明している。そこで，これらの菌叢形態にも前実験と同様の相関がみられるかどうかを究明するため，同様の実験をおこなつた（第3表）。それによると，前2菌はオリーブ炭疽病菌とおなじく，2,4-D 添加培地において菌叢周縁部が波状を呈したに対し（第1，第3図参照），稲胡麻葉枯病菌では，標準無添加区と同様ほぼ円形で，生長速度ならびに抗菌物質生成に関する既往の結果とよく一致した。そしてこの場合も，波状の程度は添加濃度，あるいは菌の種類により異なり，且つ，波状，生長速度低下のそれぞれの程度と濃度との間には，前実験と同様の相関が認められた。

第3表　2,4-D 添加寒天培地における3菌菌叢の波状形態と添加濃度との関係

供試菌	濃度（%）	波状菌叢の有無	培養経過に伴う生長速度の低下	抗菌物質の生成
柿炭疽病菌	0.2	+	++	
	0.08	++	++	
	0.04	+	++	+
	0.02	+	+	
	0.0	−	−	
スエヒロタケ	0.5	+		
	0.4	++	++	
	0.3	++	+++	+
	0.2	+++	+++	
	0.1	++	+++	
	0.0	−		
稲胡麻葉枯病菌	0.8	−	−	
	0.6	−	−	
	0.4	−	−	−
	0.2	−	±	
	0.1	−	−	
	0.0	−	−	

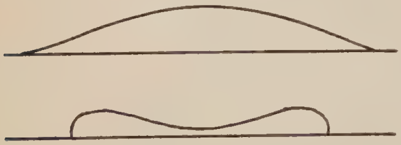


第3図　2,4-D 添加培地におけるスエヒロタケの波状菌叢
1. 0.5%　2. 0.4%　3. 0.3%　4. 0.2%　5. 0.1%　6. 標準無添加
(27–30°C で標準区は5日，他は 10 日間培養)

考　察

薬剤を添加した培地上で菌類が種種の畸形を呈することは，従来から知られているところで，例えば高濃度の inositol を添加した場合には *Ophiostoma* (*Cerastomella*) *multiannulatum* はほとんど分生胞子の形態で発育するし[4]，pentachlorophenol 添加培地の稲胡麻葉枯病菌菌糸は，ジュズダマ状の小細胞の連鎖となつたり，分枝が多くなるという[12]。本実験結果は，2,4-D ならびに類似フェノキシ化合物添加培地におけるオリーブ炭疽病菌，柿炭疽病菌，およびスエヒロタケの菌叢周縁部が波状形態となることを明示するとともに，このような波状形態は "staling" 型生長相の1特性であるという Brown らの見解が，筆者らの一連の研究に関するかぎり容認できることをものがたつている。もつとも同氏らの見解は，正常培地における実験結果に立脚しているのであるが，菌類の発育を阻害するような薬剤を添加した培地でも同様であることが，はつきりしたわけである。Richards[13]も 2,4-D および 2,4,5-T 添加寒天培地においてスエヒ

ロタケの波状菌叢を観察しているが，"staling" 型生長相の一環として本現象があらわれたのかどうかについては，論じていない。なお Brown[1,2] は，菌叢の厚みからも生長型を判別できるとのべているので（第4図参照），本実験中この点にも留意して観察をつづけた。しかし "staling" 型菌叢周縁部が厚くなる傾向は認められたものの，菌叢中心部は却つてもりあがり，菌叢全体としては中高の形態を呈するものもかなりあつたから，菌叢の厚みに関する上述の見解には，全面的な賛意を表しかねる。



第4図 Brown による "sfaling" 型(下)および "non-staling" 型(上)の菌叢側面図

"staling" 型生長相は，培地 pH の変動，培養経過にともなう栄養源の減少によるものも報告されているが，主として抗菌性を有する "staling substance" の蓄積に帰している。また，*Phytiacystis citrophthora, Phytophthora terrestris, Phomopsis citri, Diplodia natalensis* を最適以上の温度で培養するときは，培養経過につれて，生長速度がしだいに低下するという[3]。その原因については不明であるが，このような培養中における不適当な環境の累積が直接影響して，生長速度を低下せしめる場合も，予想されよう。しかるに本実験において波状形態のみられたのは，いずれも抗菌物質生成の確認されているもののみであるから，抗菌物質生成以外の，上述のような原因にもとづく "staling" 型にも，波状形態があらわれるかどうかは，こんご検討を要する1課題であろう。しかし少くとも，波状菌叢のみられぬ場合には，抗菌物質を生成しないか生成しても微量であろうことは，本実験結果から明らかである。筆者らはこれまで，抗菌物質生成を誘致するこの種薬剤のスクリーニングにさいして，1予備的手段として，主として薬剤添加培地における生長速度の動向をもとめてきたのであるが，上述の理由から，こんごは同時に，波状菌叢の有無をも併せ参照できるものと考える。

摘　要

（1） 2, 4-D, 2, 4, 5-T, MCP, CPA, および MPA のフェノキシ化合物添加寒天培地におけるオリーブ炭疽病菌菌叢は，ほとんどの供試濃度において，その周縁部が不規則な波状形態を呈した。これに反し他の薬剤では，標準無添加区と同様ほぼ円形であつた。

（2） 2, 4-D 添加培地における柿炭疽病菌，およびスエヒロタケの菌叢も，同様の波状形態を示すが，稲胡麻葉枯病菌には，これがみられない。

（3） 上述の事実，ならびに筆者ら既報の諸結果は，菌叢周縁部にみられる波状形態が "staling" 型生長相の1特性であるという Brown らの見解とよく一致する。(1957 年 12 月 17 日受理)

引 用 文 献

1) Brown, W. : Ann. Bot., 37 : 105～129. (1923).
2) ——— ; Ibid., 39 : 373～408. (1925).
3) Fawcett, H. S. : Univ. Calif. (Berkeley) Pubs. Agr. Sci., 4 : 183～232. (1921).
4) Fries, N. : Ark. Bot., 1 : 271～287. (1949).
5) Hawker, L. E. ; Physiology of Fungi. (1950). p. 29.
6) 内藤中人・小島義之 : 香川大学農学部学術報告, 9 (1) : 18～25. (1957).
7) ———・国方弘 ; 植物病害研究, 5(3) : 113～118. (1955).
8) ———・谷利一 : 香川農大学術報告, 4(2) ; 104～110. (1952).
9) ———・——— : 日植病報, 19(3, 4) : 129～132. (1955).
10) ———・——— : Ibid., 21 (2, 3) : 74～78. (1956).
11) ———・———・岸常宣 ; 香川大学農学部学術報告, 9 (2) : 66～72. (1957).
12) 奥八郎 : 植物病害研究, 5(2) : 77～82. (1955).
13) Richards, R. R. ; Botan. Gaz., 110(4) ; 523～550. (1949).

Résumé

1. The colonies of *Gloeosporium olivarum* on peptone-salts agar plate containing different concentrations of sodium 2,4-dichlorophenoxy acetate (2,4-D), 2, 4, 5-trichlorophenoxyacetic acid, 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid, 2-chlorophenoxyacetic acid, and 2-methylphenoxyacetic acid lose in general their circular outline as growth continues, and their margin becomes wavy and irregular. On the other hand, the colonies on the same medium containing 2-methylphenol, 2-chlorophenol, 2,4-dichlorophenol, potassium α-naphthaleneacetate, and $CuSO_4$ resembled the controls in the regularity of their periphery.

2. Morphological responses of *Gloeosporium kaki*, and *Schizophyllum commune* to 2,4-D were similar to those of *G. olivarum* in showing irregularity of periphery, while those of *Cochliobolus miyabeanus* to the chemical were indistinguishable from the controls except for smaller size.

3. These results support the view of Brown and others who stated that such an irregularity of colonies is a characteristic of the "staling-type" growth.

(Faculty of Agriculture, Kagawa University)

土壌殺菌剤に関する研究

第1報　有機水銀化合物の土壌中における殺菌作用

竹内英郎・井出陽郎*

Hideo Takeuchi and Haruo Ide: Studies on the Soil Fungicides. I. Fungicidal Action of the Organic Mercury Compounds in the Soil.

I. 緒　　言

土壌中に施した有機水銀化合物が土壌粒子に吸着されることは Booer[1], 宇井[2] の報告によつて明らかにされている。宇井[2] は有機水銀化合物は土壌に吸着されることによつて変性し殺菌力の低下を来すが，その一部は気化して土壌中に拡散して殺菌作用を示すという。また Booer[1] はこの吸着現象を有機水銀化合物 R･Hg･X のX基すなわち酸基が粘土に置換されて R･Hg･Clay になると説明している。

筆者らは土壌に一旦水銀化合物を注入した後，蒸溜水を加えて洗滌し，濾化し，濾液と洗滌したあとの土壌とのそれぞれについて殺菌力を調べ，有機水銀化合物の種類により土壌注入後の殺菌力の減退状況に差のあることを見出したので以下その結果を報告する。

本実験は当研究所次長石山哲尓博士の指導の下に実施したもので，供試した各水銀化合物はすべて当研究所兼子隆夫博士の合成によるものである。ここに記して謝意を表する。

II. 実験材料と方法

1. 実験材料

Cup method による殺菌力の検定には麦類斑点病菌 *Ophiobolus sativus* Ito et Kuribayashi をホプキンス培養基に 25°C で2週間培養したのを供用した。

土壌は第3期の腐植に富む砂壌土を用い，これに水銀化合物を注入した。

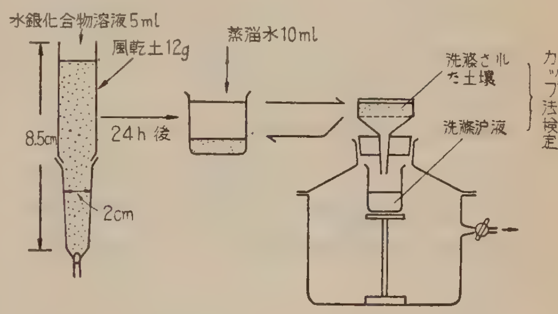
供試した水銀化合物は次の4種である。

化合物名	構造式	Hg含量(%)	融点(°C)
Methyl mercury iodide	CH_3HgI	58.5	145
Methoxy ethylmercury chloride	$CH_3OC_2H_4HgCl$	67.9	167
Ethylmercury phosphate	$(C_2H_5Hg)_2HPO_4$	72.2	176
Phenylmercury acetate	$-HgOCOCH_3$	58.5	149

薬液濃度は CH_3HgI は 2×10^4 倍液，他の化合物は 7×10^3 倍液とした。

2. 実験方法

第1図に示す管びんに風乾土壌 12g をつめた後，各化合物の溶液 5ml を灌注し，24時間，25°C に保つ。その後土壌をビーカーに移し蒸溜水 10ml を加えて洗滌し，東洋沪紙定量用 No 2，1枚をブッフナー沪斗に敷いて吸引しながら沪過する。このような洗滌を8—14回くり返し，各回の沪液と洗滌後の土壌とについて cup method により殺菌力を検定した。



第1図　水銀剤を土壌に注入した後，洗滌し，沪液と土壌とを分けるまでの順序

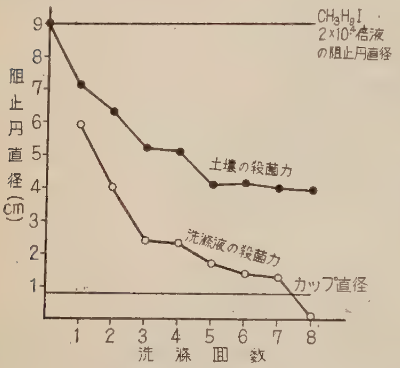
III. 実験結果

1. CH_3HgI の殺菌作用

本化合物の 2×10^4 倍溶液を土壌に注入し，その洗

* 北興化学工業株式会社中央研究所

滌液と洗滌後の土壌について殺菌力を検定すると第2図に示すような結果を得る。溶液を注入した土壌の殺菌力は溶液自体の殺菌力と等価を示している（第2図洗滌回数0）。この土壌を洗滌していくと洗滌回数の進むにしたがつて土壌の殺菌力は低下するが5回以降はほぼ一定の殺菌力を保持する。これに対して洗滌液の殺菌力は洗滌回数の重なるにしたがつて低下し，8回の洗滌で全く殺菌力を示さなくなる。



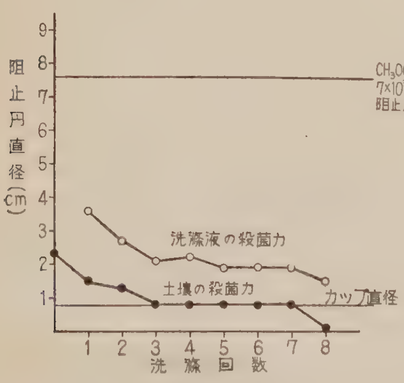
第2図　CH_3HgI の土壌注入，ならびに洗滌による殺菌力変化の状況

以上の結果は本化合物が土壌粒子に吸着されてもなお殺菌力を保持することを示している。

2.　$CH_3OC_2H_4HgCl$ の殺菌作用

この化合物の 7×10^3 倍液を土壌に注入した場合の土壌，土壌の洗滌液，及び洗滌後の土壌，の殺菌力は第3図に示す通りである。

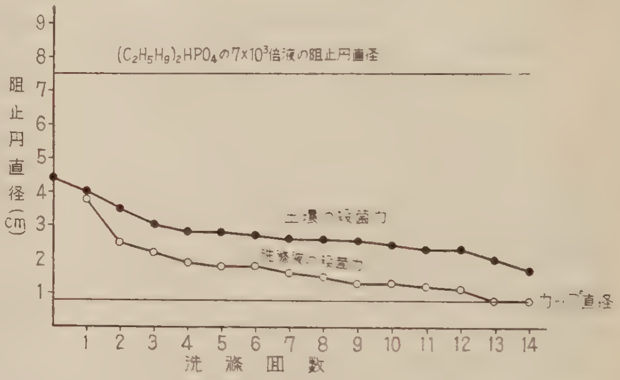
溶液を注入した土壌の殺菌力はメチル沃化水銀の場合と異り，溶液そのものの殺菌力に比べて著しく低下している。洗滌回数を重ねるにしたがい，洗滌液は殺菌力を保持するが，土壌は3回目で早くも殺菌力を失う。洗滌3回以降，土壌が殺菌力を失つた後でも洗滌液は殺菌力を保持していることは注意を要する。



第3図　$CH_3OC_2H_4HgCl$ の土壌ならびに洗滌による殺菌力変化の状況

3.　$(C_2H_5Hg)_2HPO_4$ の殺菌作用

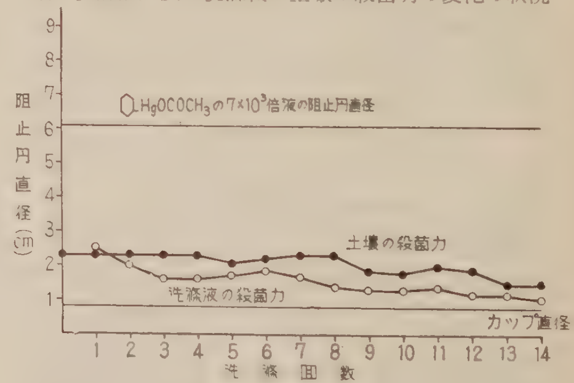
本化合物の 7×10^3 倍液を土壌に注入した場合の土壌，洗滌液，及び洗滌後の土壌の殺菌力の低下の状況は第4図に示す通りである。溶液を注入した土壌の殺菌力は溶液自体の殺菌力に比べて劣つてはいるがメトキシエチル塩化水銀の場合程著しく低下はしていない。その土壌を洗滌していくと土壌の殺菌力は徐々に低下するが14回の洗滌を重ねてもなお殺菌力を保持している。一方洗滌は洗滌回数を重ねるにしたがい徐々に殺菌力を低下し，13回目に漸く殺菌力を失うにいたる。



第4図　$(C_2HsHg)_2HPO_4$ の土壌注入ならびに洗滌による殺菌力低下の状況

4.  **$-HgOCOCH_3$ の殺菌作用**

本化合物の 7×10^3 倍液を土壌に注入した場合，土壌，洗滌液，及び洗滌後の土壌の殺菌力の変化の状況



第5図　$_HgOCOCH_3$ の土壌注入及び洗滌による殺菌力低下の状況

は第5図に示す。この場合，溶液を注入した土壌はメトキシエチル塩化水銀の場合と同様に著しく低下している。洗滌液の殺菌力もまた著しく低下している。しかし，洗滌回数を重ねても殺菌力は低い値を保持しながら全く失われることはない。

Ⅳ. 論　　議

有機水銀化合物を土壌に注入すると速かに殺菌力を低下乃至喪失することは宇井[2]も既に認めている所であるが，本実験においてもメトキシエチル塩化水銀，フェニール酢酸水銀はその傾向を顕著に示し，エチル燐酸水銀はそれ程ではないが同様の傾向を示した。それに反してメチル沃化水銀は土壌注入により殺菌力低下の傾向を示さなかつた。

先に兼子[3]は RHgI，$RHgSCH_3$ などのように Hg と非常に親和性の強い化合物は，他の化合物と異つて，水溶液においてもRHg^+に解離することなく，負に荷電した醋塩の形になつており，そのために土壌との陽イオン交換反応は少く，したがつて土壌に吸着され難いとのべている。このことより判断すれば，メチル沃化水銀は $[CH_3HgI]^-$ の形で土壌中に遊離の状態で存在し，吸着されることなく，殺菌力を現わすものと考えられる。しかしながら，この化合物の注入された土壌を5回以上洗滌してもなお一定程度の殺菌力を保持し，それ以上の減退を来さぬということは，何らかの殺菌力を保持した形で土壌に結合することがあることを示している。

メトキシエチル塩化水銀，フェニール酢酸水銀は土壌に注入されることによつて速やかにその殺菌力を低下する。このことは Booer[1] の RHg+clay の形になつた結果本来の殺菌力を失つたものと解しうる。これに反し，エチル燐酸水銀は土壌に注入された後，上記2化合物に比べれば，その殺菌力減退の程度は少く，相当の殺菌力を保持している。本化合物が粘土と結合してもなお R・Hg の R そのものの構造に支配されて殺菌力を表すのか，或は結合が弱く容易に分離するのか，何れかの可能性をもち，前記2化合物と異る行動をとるものと推測される。

メトキシエチル塩化水銀は土壌に注入されることで殺菌力を失うが，その洗滌液は殺菌力をもつている。この事実は，洗滌液中に元の化合物のままで存在することに基くか，或は土壌通過後，別な化合物に変化し，それが洗滌液中にあつて殺菌力をもつことに基くか，なお疑問である。

なお，この実験では土壌洗滌後沪紙を用いて沪過しているので沪液中には 0.2μ 以下の土壌コロイドは含有されていると思われるから洗滌液中に含まれる水銀化合物がすべてコロイドと遊離した状態にあるとは云い難い。この点は今後の研究にゆずることとするが，少くとも自然条件下で土壌中で水と共に移動し得る部分であることは確かである。

上記のようにメチル沃化水銀の場合土壌に吸着されてもなお殺菌力を保持している。この事実は単に土壌粒子に吸着されることだけで水銀剤の殺菌力喪失を説明し得ないこと，および，土壌粒子による吸着も単にカチオン交換反応だけでは説明し得ないこと，を示している。要するに今後水銀化合物を土壌殺菌剤として用いる場合，水銀剤の化学構造と土壌中における行動と関連して多くの問題があることに注意を喚起したい。

Ⅴ. 要　　約

4種の有機水銀化合物を土壌に注入した後土壌，及びその土壌の洗滌をくり返すことにより洗滌された土壌と洗滌液の殺菌力の変化する状況を比較検討した。

1. CH_3HgI は土壌に注入することによつて殺菌力の低下を起さない。またその土壌を洗滌しても完全に殺菌力を失うことなく，一部は土壌中に保持されて殺菌力を保持する。

2. $CH_3OC_2H_4HgCl$ は土壌に注入することによつて速かに殺菌力を失うがその洗滌液は殺菌力を有する。

3. $(C_2H_5Hg)_2HPO_4$ は土壌に注入すると殺菌力は若干低下し，その殺菌力は洗滌によつて徐々に低下し，洗滌水そのものは殺菌力を示す。

5.  $-HgOCOCH_3$ を土壌に注入すると速かに殺菌力を著しく低下し，洗滌液もまた低い殺菌力を示す。

(1957年11月30日受理)

引 用 文 献

1) Booer, J.R：Ann.appl., Biol. 31：340～359. (1944).
2) 宇井格生：日植病報，20 (1)：39. (1955).
3) 兼子隆夫：日本植物病理学会昭和32年度大会〃水銀剤に関するシンポジウム〃講演

Summary

In the present study, the writers compared the changes of fungicidal activities of four organic mercury compounds, i. e., methylmercury iodide, ethylmercury phosphate, methoxyethyl mercury chloride, and phenylmercury acetate, after they were applied to soil. Ten ml. solution of each compound was applied 12 g. soil. kept at 25°C. for 24 hours, and the fungicidal activity of the soil-organic mercury compound mixture was assayed on the plate culture of *Ophiobolus sativus* by the use of cup method. After this, the soil was washed with 10 ml. distilled water, filtered through Toyo Filter paper NO. 2, and the fungicidal activity of the filtrate and that of soil residue were assayed by the same method. This procedure was repeated 8 to 14 times.

1. Methylmercury iodide-soil mixture had a fungicidal activity equal to that of the methylmercury iodide solution. After repeated washing with distilled water, the fungicidal activity of the soil residue decreased, but it still maintained a certain constant level (Fig. 2). This suggests that the compound combines with soil particles without losing the fungicidal activity.

2. Methoxyethylmercury chloide-soil mixture showed a very low fungicidal activity. By repeatedly washing the soil with distilled water, the soil residue lost rapidly the fungicidal activity, but the filtrate maintaind a certain leʌel of activity (Fig. 3).

3. Ethylmercury phosphate-soil mixture had a fairly high fungicidal activity. The fungicidal activity of filtrate and soil residue, obtained by washing the soil with water, decreased gradually with the repetition of washing (Fig. 4).

4. Phenylmercury acetate-soil mixture showed a very low fungicidal activity. The soil residue and the filtrate, obtained by washing the soil with water, maintained a very low fungicidal activity, decreasing gradually with the repetition of washing.

Above results suggests that the Booer's hypothesis (1944) is true with the latter three compounds, but it is not true with methylmercury iodide. (Hokko Chem. Company)

文 献 紹 介

罹病植物と健全植物の汁液からペーパークロマトグラフイーによつて得られたフラクションの電子顕微鏡像

H. W. J. Ragetli, Christina van der Scheer en J. P. H. van der Want: Electronenmicroscopie van papierchromatografisch verkregen fracties van plantensappen uit virusziek en gezond materiaal: Tijdschr. over Plantenz., 61: 35～46. (1955).

Ragetli & Van der Want は 1954 年ペーパークロマトグラフイーによつて TMV を分離し，同年 Van der Want はこれを bean viruses の分離にも応用している。分離はろ紙を長さ 57 cm，幅 6 cm に切り，端から 6 cm の所に葉の汁液 0.09 ml (1 %KCN を加えて 0.1 %にした) を添付し，蒸溜水を用いて降下法で展開した。44 cm 降下した時 22ケに分割し，その各々を 0.5 ml の蒸溜水で抽出して接種試験，及び電顕像をみた。又別に同様の操作によつて展開後，乾燥したものについて紫外線 (265 mμ) 吸収をみた。著者等が用いたウイルスは tobacco mosaic virus，tobacco rattle virus，potato virus X，tobacco necrosis virus，cucumber mosaic virus，tomato bushy stunt virus である。TMV と potato v. X. とはこの方法によると長さが著しく均一に得られる，tobacco rattle virus は長さにより 3 つの群に分けられる。CMV は非常に小さく，大きさのやや不規則な粒子で，tomato bushy stunt virus は Price & Wyckoff (1946)によつて分離された球状粒子に似ているが，明らかに多角形を示しており，多面体ではないかと思われる。健全植物の汁液を用いた場合には，対照するフラクションに特長ある粒子は見られず，多くの場合，何も見られなかつた。紫外線吸収帯には多量の無定形の物質がみられたが，tobacco necrosis virus を除いてはウイルスを含む部分とは重複しなかつた。この方法は植物ウイルスを電顕で見る場合には簡便であり，他の多くの方法に比べて，操作中ウイルスに作用を及ぼす事がより少いと思われる。

(栃原比呂志)

キュウリ露菌病菌の分生胞子形成の観察

梶原敏宏・岩田吉人*

Toshihiro KAJIWARA and Yoshito IWATA : Observations on the sporulation of cucumber downy mildew fungus.

植物病原菌の病斑上での胞子形成に関しては，稲熱病で豊田・鈴木[4]，稲胡麻葉枯病で深津・柿崎[1]，稲小球核病で野中・吉井[3]，キュウリうどんこ病で Yarwood[5] がそれぞれ観察を行つている。キュウリ露菌病菌では分生子梗は気孔から弧生，または叢生し，3～5回叉状に分岐した分枝上に分生胞子が1個ずつ着生することが知られているが，その形成の順序についてはまだ明らかにされていない。また本菌以外の露菌科の病菌でも観察されていない。著者らは本菌の分生胞子の形成過程を明らかにし，今まで観察された植物病原菌と比較するため観察を行つたのでその結果の概要を報告する。

本稿を草するに当り，材料採集の便をはかられた静岡農試河合場長，森技師に厚く御礼申し上げる。

1. 材料と方法

供試した病斑は 1956 年3月静岡市久能のキュウリから採集した菌をガラス室内で6寸鉢で育てたキュウリ（相模半白）の7～10 葉のものに，20°C で接種，引続き 20°C に7～14 日間おいて発病させたものである。病斑は 7.00 p.m.～10.00 p.m. の間に採集し，約 1cm×2cm の大きさに切り，すでに形成されている分生子梗，分生胞子を水で洗い落した後，豊田ら[4] が行つた方法に従つて連続観察した。観察および写真撮影時以外は暗黒とし，また湿室の上部の観察穴はスライドグラスで覆つた。観察は 1956 年9月 13，14 および 19 日の3回，22～26°C の室内で行つた。

2. 観察結果及び考察

前述の方法によつて観察した結果は第1表に示す通りである。観察と同時に撮影した顕微鏡写真は第1図版である。

先ず分生子梗の形成は供試材料装置後2時間で始まる。9月 13，14 日の観察でも2時間で分生子梗が形成され始めるものを認めたが，分生子梗が途中で伸長を停止したり，観察の手違いなどによつて全過程について観察出来なかつたので，第1表には同一分生子梗について，その形成の始めから分生胞子の完成までの全過程を継続観察出来たものを揚げた。この結果からみられるように分生子梗は早いものは2時間で形成が開始され次々に他のものが形成されて行くと考えられる。

第1表　キュウリ露菌病菌の病斑上での分生胞子形成の経過

観察月日	9.13	9.14	9.19
温度(室温)	24～26°C	23～24°C	22～23°C
実験開始時間	10.00p.m.	8.00p.m.	7.00p.m.
分生子梗出現	$4^h\ 00^m$	$4^h\ 30^m$	$2^h\ 00^m$
分岐開始	8 10	9 10	6 30
分枝数 3	8 15		6 40
〃 4		9 15	6 45
〃 6		9 25	
〃 8			7 00
〃 12			7 15
分生胞子形成開始	8 30	9 40	7 20
分生胞子の着色開始	9 00	10 10	7 35
分生胞子の完成	9 30	10 30	8 30

〔註〕数字は実験開始からの経過時間数を示す

分生子梗が出来始めてから約4時間 10 分～4時間 40 分で分岐が始まる。しかし前述のようにある程度伸びた後でも条件によつては伸長を停止，遂に胞子形成に至らないものも見られた。伸長を停止するものは分生子梗の形成初期に停止するものが多く，長く伸長してから停止するものは少ないようである。

分岐して出来た各分枝は，さらに2つに分岐する。このようにして次々に分岐していくから 4,8,16 と等比級数的に増加するものと考えられるが，途中で分岐を停止する分枝もあつて，必ずしもこのような分枝数とはならないものもある。第1表に掲げた9月 13,14 日の実験での分枝数は非常に少ないが，岩田[2] は温度 25～26°C では 2～6 回の分岐を行うことを観察しているから，継続観察し得た分生子梗は分岐回数の少な

* 農林省農業技術研究所

いものを選んだのであろう。分岐開始から分生胞子形成開始までの時間は非常に短く 20～50 分であつた。

分生胞子は分枝（極枝）上に一斉に形成される。はじめ極枝の先端に小さい透明な突起を生じそれが急速に大きくなる。形成開始 15～30 分で着色し始め，50～70分で完成する（完成は乳頭突起が見られるようになるのを標準とした）。

稲熱病，稲胡麻葉枯病，稲小球菌核病で豊田ら[4]，深津ら[1]，野中ら[3]が観察した結果では，何れも分生胞子は始め 1 個完成して後，次の分生胞子の形成が始まるようであるが，本菌では分枝（極枝）上に一斉に形成される点が非常に異つている。また分生胞子形成に要する時間は深津らは担子梗の形成される時間の1/3に過ぎないとしているが，本病では更に短かく，1/5～1/6 の時間で完成される。

本菌の分生子梗は分岐を開始してから，乾燥などの悪条件に出あつた場合，直ちに分岐を停止し分生胞子を形成し始める。しかし分生胞子は，既にその形成過程にあるものでは殆んど影響は認められず分生胞子の形成が完了するようである。

Yarwood[6] はホツプ，レタス等の露菌病菌について分生胞子形成に diurnal cycle があり夜間でないと形成しないと報告しているので，本実験は形成過程を的確に知る目的から夜間，しかも観察時以外は暗黒下で行つたが，光線の有無によつて形成に要する時間等がかなり異なるのではないかと考えられる。これらについては別に実験を行つたので稿を改めて報告したい。

3. 摘　　要

キュウリ露菌病の病斑上での分生胞子の形成順序について観察を行つた。

(1). 供試材料を装置後約 2 時間で分生子梗の形成が開始される。分生子梗が僅かに伸びてから伸長を停止するものがかなり見受けられるが，これらは分生胞子を形成するに至らなかつた。

(2). 装置後 6 時間 30 分～9 時間で分生子梗の分岐が始まる。分岐は次々に叉状に行われるが，分枝によつては分岐を停止するものもあるので最終の分枝(極枝)数は一定しない。

(3). 装置後 7 時間 20 分～9 時間 40 分後に分生胞子の形成が始まる。分生胞子は極枝の先端に 1 個づつ一斉に形成され　はじめ無色であるが形成の半ば頃から着色する。分生胞子は 50～70 分の極めて短い時間で完成する。

(4). 分生子梗が分岐中に悪条件にあえば直ちに分岐を停止して胞子形成を開始する。

(1957 年 11 月 14 日受理)

引　用　文　献

1. 深津量栄・柿崎正：日植病報，19 (3, 4)：117～119.（1955).
2. 岩田吉人：日植病報，11(4)：172～185.(1942).
3. 野中福次・吉井甫：九大農学芸誌．15(4)：435～440.（1956).
4. 豊田栄・鈴木直治：日植病報，17 (1)：1～4.(1952).
5. Yarwood, C. E. : Jour. Agr. Res., 52 (9) : 645～657. (1936).
6. ―――――――― : Jour. Agr. Res., 54 (5) : 365～373. (1937)

図 版 説 明（実験開始時間：1956 年 9 月 19 日 7.00 p.m.）

使用顕微鏡：日本光学 KUG ×150

写 真 撮 影：アサヒフレツクス ⅡA

（1） 実験開始後 4 時間 30 分，分生子梗はまだあまり長くない。

（2） 5 時間後

（3） 5 時間 30 分後，かなり分生子梗伸びる。

（4） 6 時間後，分生子梗に附着しているのは，水滴である。

（5） 6 時間 30 分後，分生子梗の分岐開始

（6） 6 時間 45 分後，分生子梗の分枝数 4 本

（7） 7 時間後，分枝数 8 本

（8） 7 時間 15 分後，分枝数 12 本

（9） 7 時間 20 分後，各分枝の先端に小さい突起(分生胞子）を生ずる。

(10) 7 時間 35 分，分生胞子はかなり大きさを増し，この頃より着色開始

(11) 8 時間 30 分後，分生胞子完成

(12) 7 時間 35 分後，下部に短い分生子梗が見られるがこれは実験開始 2 時間後より伸長はじめ，途中伸長を停止したものである。

Summary

Sporulation process of cucumber downy mildew fungus (*Pseudoperonospora cubensis*) was studied, and microphotographed by use of the methods adopted by Toyoda and Suzuki (1952) for rice blast fungus.

The diseased leaf was detached at 7.00-8.00



第1図版　　キュウリ露菌病菌の病斑上での分生胞子形成の順序

p.m. from the potted cucumber plants grown in the greenhouse, and its surface was washed with water to remove the existing conidiophores. The lesion was then cut off into a piece of 1×2 cm. and placed in a moist cell under a microscope in a dark room, at 22-26 °C. for periodical observation.

After the leaf lesion was placed in the moist cell, conidiophores emerged through the stomata from 2 to 4 1/2 hours, and began to branch dichotomously from 6 1/2 to 9 hours. They continued to branch in the same manner until they had 3 to 16 ultimate branchlets. 20 to 50 minutes after the beginning of branching, a small hyaline projection was produced almost simultaneously at each ultimate branchlet of a conidiophore. This projection developed, to a mature conidium 50 to 70 minutes later, turning grey.

When the conidiophore which had begun to branch was subjected to unfavorable conditions such as drying, it stopped to branch and turned to produce conidia.

(Nat. Inst. Agr. Sci.)

雑　録

エビズルのべと病菌

岩　田　吉　人*

Yoshito IWATA: Downy mildew fungus on *Vitis Thunbergii* Sieb. et Zucc.

エビズル (*Vitis Thunbergii* Sieb. et Zucc.) は山野に普通に見られる植物でべと病が発生する。その病原菌はブドウべと病菌 *Plasmopara viticola* (Berk. et Curt.) Berlese et De Toni とされているが，少なくも我国では寄生性や形態の異同について調べられていないようである。筆者は昭和15年津市郊外で採集したエビズルべと病菌及び三重高等農林学校附属農場に発生したブドウべと病菌を用いて寄生性及び形態の比較を行つた。

接種には病葉上の既成分生胞子を水で洗い落し，1夜湿室において形成させた新鮮な分生胞子を用いた。また健全なブドウ，エビズル及びノブドウ (*Ampelopsis heterophylla* Sieb. et Zucc.) の茎を切り，これをビーカーに挿し，その葉の裏面に分生胞子浮遊液を噴霧接種して24時間湿室に保つた。実験は3回繰返し行つたが，ブドウ及びエビズルのべと病菌はそれぞれエビズル及びブドウをよく侵害し，胞子を形成するに到つた。しかし，ノブドウは両菌に対して何ら反応を示さなかつた。

次に形態についてはべと病菌の分生胞子及び分生子梗の大きさが形成時の温度により非常に異なることが知られているので，病斑上の既成分生胞子及び分生子梗を水で洗い落した後，24° C で1夜湿室におき新生したものについて比較した。卵胞子は得られなかつたので，供試出来なかつたが，分生胞子及び分生子梗の大きさは表示のように両者の間に差が殆んど認められない。従つてブドウ及びエビズル上のべト病菌は同一と見て差支えないと考えられ，また実際にエビズル上の菌がブドウに伝染する機会もあり得ると思われる。

ノブドウも *Plasmopara viticola* の寄主植物のひとつとして挙げられているが，上に記したようにブドウ及びエビズル上の菌はノブドウを侵さないから，ノブドウ上の菌は寄生性において異なるものであろう。なおこの実験は昭和15年三重高等農林学校で行つたものである。

ブドウ及びエビズルのべと病菌の形態の比較

寄主植物	分生胞子				分生子梗									
	長さ μ		幅 μ		全長 μ		主軸の長さ μ		主軸の幅 μ		分岐回数		極枝 μ	
	範囲	平均	範囲	平均	範囲	平均	範囲	平均	範囲	平均	範囲	平均	範囲	平均
ブドウ	10—23	15.5	9—15	11.4	29—100	64.0	23—78	50.1	3—5	4.3	3—6	4.2	2—8	4.4
エビズル	9—24	14.5	9—18	11.4	40— 80	64.0	28—70	47.4	3—5	4.3	3—5	3.9	3—6	4.6

供試数は分生胞子 300 個，分生子梗 100 個

* 農林省農業技術研究所

タバコ黒色根腐病菌 *Thielaviopsis basicola* (Berk. et Br.) Ferraris の培養上の 2, 3 の性質

山口洋一*

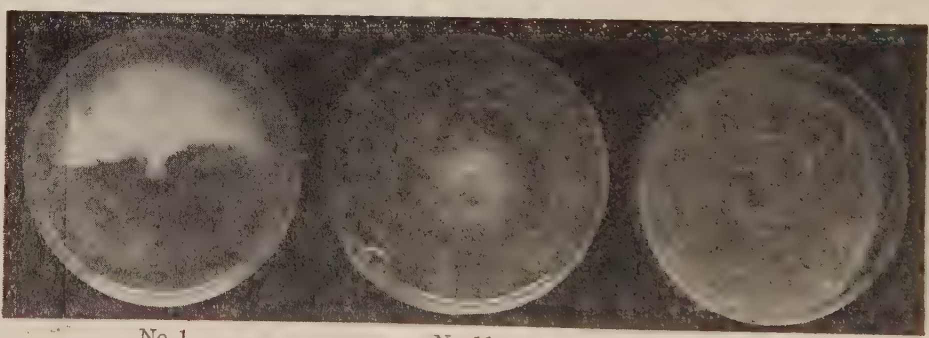
Yoichi YAMAGUCHI: On some cultural characters of tobacco black root rot fungus, *Thielaviopsis basicola* (Berk. et Br.) Ferraris.

タバコ黒色根腐病については多くの報告がなされているが，その病原菌の栄養生理に関しては，Stover[10]の栄養と生長および厚膜胞子形成との関係について，Lilly ら[7]の糖の影響についての報告があるにすぎない。培地上の適温については報告が多いが，それらは必ずしも一致せず，Gilbert[1]は 28～32°C，Johnes ら[2]は 28～30°C，Lucas[4]は 26°C，中村[6]は 25～28°C，大谷[7]は 20～24°C であると述べている。培地の pH についての詳細な研究は今日まで全くおこなわれていない。筆者は *T. basicola* の培地上の生長におよぼすN源，温度および pH の影響を検討したのでその結果を報告する。

本研究をおこなうにあたつて，御指導を賜わつた当場病虫部長日高醇博士に感謝の意を表する。

実験材料と方法

合成培地およびジャガイモ煎汁培地を用いた。合成培地の組成は次の如くである。蒸溜水 1*l*，K_2HPO_4 1g，KCl 0.5g，$MgSO_4$ 0.5g，$FeSO_4$ 0.01 g，thiamine hydrochloride 0.5 mg を基礎成分とし，N源は 1g の asparagine monohydrate のN量と当量になるように加えた。C源には 2％の sucrose または glucose を用い，固体培地にはさらに 2％の寒天を加えた。培地の pH の調整には 1 N の HCl と NaOH とを用い，pH の測定は Beckman pH測定器によつた。培地の滅菌は酸度の高いものを除き，固体培地は加圧蒸気滅菌（10 lbs 15 分）を，その他は 98°C 20 分の間けつ滅菌をおこなつた。平面培養では径 9 cm のペトリ皿に 20 ml の培地を入れ，液体培養では特に記すものを除き，100 ml の三角フラスコに 20 ml の培地を入れた。供試菌株を 26°C で 14 日間ジャガイモ煎汁寒天で平面培養し，この集落を培地とともに径 3 mm の円盤に切り，接種源として用いた。固体培養では集落の直径を，液体培養では菌体乾燥重を測定して生長量とした。菌体乾燥重は，沪紙で沪別した菌体を稀塩酸で洗い，さらに蒸溜水で充分洗つた後 80°C で恒量になるまで乾燥して秤量した。



No. 1　　No. 11　　No. 13

Sucrose 加用ジャガイモ煎汁培地に 10 日間26°Cで培養したもの

第1図　供試菌株の集落

供試した *T. basicola* は，罹病したタバコの根から分離した当研究室保存の菌株であつて，そのうち No. 1，No. 11，No. 13 の 3 株を用い，一度タバコを通して使用した。ジャガイモ煎汁寒天培地上の性質は次の如くである（第1図）。No. 1 の集落は灰黒色，表面粉状で扇状の白色変異を生じやすい。No. 11 は暗緑褐色で表面菌糸が多く，内生胞子の形成量が比較的少ない。No. 13 の集落は淡黒褐色である。各菌株

* 秦野たばこ試験場

の病原性は，汚染土壌に植えたタバコの根の罹病度と，タバコの数品種の幼茎に接種した菌の生長とから[7] No. 11 が他の2株よりも弱く，No. 1 と No. 13 は同程度であると考えられた。

実験結果と論議

1) 栄養条件と生長

平面培地上の生長：glucose をC源とした合成培地を用い集落の生長におよぼすN源の影響を調べた結果は第1表の如くである。

第1表　各種N源と *T. basicola* の生長および胞子形成量

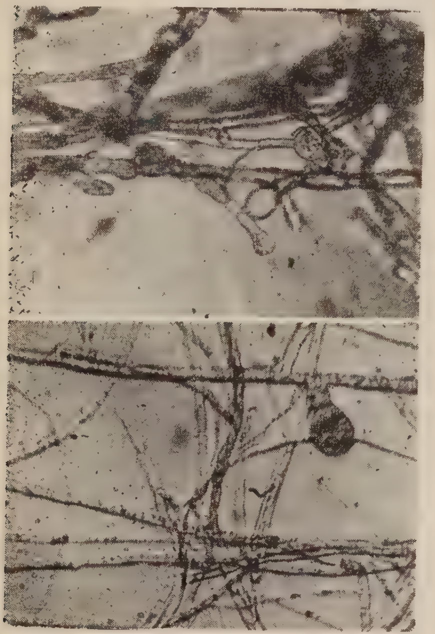
N　源	集落の直径 (mm)		内生胞子形成量		厚膜胞子形成量	
	No. 11	No. 13	No. 11	No. 13	No. 11	No. 13
KNO_3	生長せず	生長せず				
$NaNO_3$	〃	〃				
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	〃	〃				
$Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	〃	〃				
NH_4Cl	23	29	+	++	+	+++
$(NH_4)_2SO_4$	30	32	±	+	+	+++
$(NH_4)_2HPO_4$	33	45	+	++	+	+++
$(NH_4)_2C_2O_4 \cdot H_2O$	23	21	+	+++	+	+
$(NH_4)_2H \cdot C_6H_5O_7$	44	64	+	+++	+	++
$(CHOHCOONH_4)_2$	41	56	+	+++	+++	+
dl-alanine	48	66	++	+++	++	++
l-leucine	53	71	+	++	++	±
l-aspartic acid	38	73	+	+	+	+
l-glutamic acid	52	57	++	++++	++	++
l-histidine・$HCl \cdot H_2O$	43	79	+	+++	++++	+
l-arginine・HCl	31	43	+	++	++++	+++
asparagine	39	52	++	+++	++++	+++

備考：26°C で7日間培養　　胞子形成量の符号は，++++：極多，+++：多，++：相当量，+：少量，±：稀

T. basicola は NO_3-N をN源としたときは全く生長しない。NH_4 の有機塩と無機塩とでは生長に大差はなかつたが，アミノ酸およびアミドと比較すると，菌糸の生長，胞子形成量ともに後者がすぐれている場合が多かつた。No. 13 の内生胞子量は $(NH_4)_2SO_4$, aspartic acid をN源としたとき著しく少なく，asparagine を用いた培地では多かつた。alanine, glutamic acid および asparagine を用いたとき，No. 11 と No. 13 とのどちらも菌糸の生長と胞子形成量が大であつた。No. 11 の内生胞子形成は No. 13 とほぼ同じ傾向を示したが，形成量は少なく，$(NH_4)_2SO_4$ をN源としたときはほとんど見出されなかつた。No. 11 の厚膜胞子はアミノ酸または asparagine を用いた培地に多い傾向を示し，NH_4-N では酒石酸塩のほかは極めて少なかつた。No. 13 ではこの傾向が逆であつて，とくに NH_4 の無機塩では多量の胞子が観察された。No. 13 の場合にはシュウ酸アンモニウム，aspartic acid および histidine では厚膜胞子が少なく，leucine ではほとんど認められなかつた。以上の結果から alanine, glutamic acid および asparagine がすぐれたN源であり，またN源が胞子形成におよぼす影響は，胞子の種類および菌株によつて異なつていると考えられる。また厚膜胞子の着色は No. 11 がよく，No. 13 は淡色であつた。NH_4 の無機塩をN源としたとき NO. 11 の菌糸が異常を示した。これは Stover[9] も土壌寒天培地で胞子から伸びた菌糸に認めている。No. 13 ではこのような異常は認められなかつた（第2図）。Stover によると，*T. basicola* は glucose 加用ジャガイモ煎汁寒天培地上の形質で褐色型と灰色型にわけられ[9]，これらは生長や厚膜胞子形成におよばすN源の影響をも異にすると述べたが[15]，本実験に用いた褐色型と思われる2菌株の間には胞子形成におよばすN源の影響に差が認められた。sucrose または glucose加用ジャガイモ煎汁寒天培地上では，No. 13 はほとんど扇状の白色変異を生じないが，アミノ酸をN源とした合成培地上では発生が多かつた。これからみれば，この変異の出現に栄養条件も関与することが想像される。集落の色は No. 11 は olive brown から olive green を示すものが多く，No. 13 はこれよりも灰褐色がかつていた。

液体培地における生長：用いた培地の組成は第2表の如くである。これらの培地を 200 ml の三角フラスコに 100 ml ずつ入れ，No. 11 を接種源とし 26°C で 20 日間培養した。結果は第3表に示す。asparagine をN源とした合成培地に $CaCO_3$ を加用したとき最もよく生長した。培地に $CaCO_3$ または Na_2HPO_4 を加えると，pH はアルカリ側に変化し，菌体乾燥重が増加した。しかしこの pH の変化の大きさはN源に

よつて異なり，$(NH_4)_2SO_4$ では 0.39，asparagine では 0.26，aspartic acid では 0.15 であつた。菌体重の増加はそれぞれ 80 %，42 %および 61 %であつて，その増加は必ずしも pH 価の上昇によるものではないようである。glucose 加用ジャガイモ煎汁培地に $CaCO_3$ を加えたものの pH の経時変化は $CaCO_3$ を加えないものよりも常に小さく，また asparagine をN源とし $CaCO_3$ を加えたときの pH の経時変化の幅が小さいことが認められた (第3図)。Steinberg[8] の記したように Ca に微量要素としての役目もあるかもしれないが，菌体重の増加の理由の一部は，$CaCO_3$ によつて pH の酸性側への変動が少なくなり，好適な pH に保たれるためであると思われる。Stover[10] は $(NH_4)_2SO_4$ をN源としたとき Na_2HPO_4 加用により，またはN源に$(NH_4)_2HPO_4$ を用いることによつて，合成培地に緩衝能を与えると菌体重が増加すると述べた。本実験でも Na_2HPO_4 加用の培地では菌体重が増加したが，培養中の pH の変化がかなり大きいので，この増加が緩衝作用によるものであるとは考えられない。


A

B

第2図 No. 11 の菌糸
A: $(NH_4)_2HPO_4$をN源とした合成培地で生長の初期に認められた異常菌糸
B: sucrose 加用ジャガイモ煎汁寒天培地で生長した正常な菌糸

第3表 N源を異にした液体培地に 20 日間培養した No. 11 の菌体乾燥重

培地の種類	接種前の pH	培養後の pH	菌体乾燥重
a-1	7.02	4.63	575 mg
a-2	7.28	6.61	814
a-3	7.40	6.34	743
b-1	7.29	5.59	419
b-2	7.44	5.95	676
c-1	6.94	3.67	187
c-2	7.33	6.42	336
c-3	7.61	6.55	292
c-4	7.12	3.40	234
d-1	7.00	——	——
b-2	7.05	——	——
p-s	6.71	4.41	333
p-g	6.53	4.20	267

——は生長を全く認めなかつたもの，培養温度は 26°C

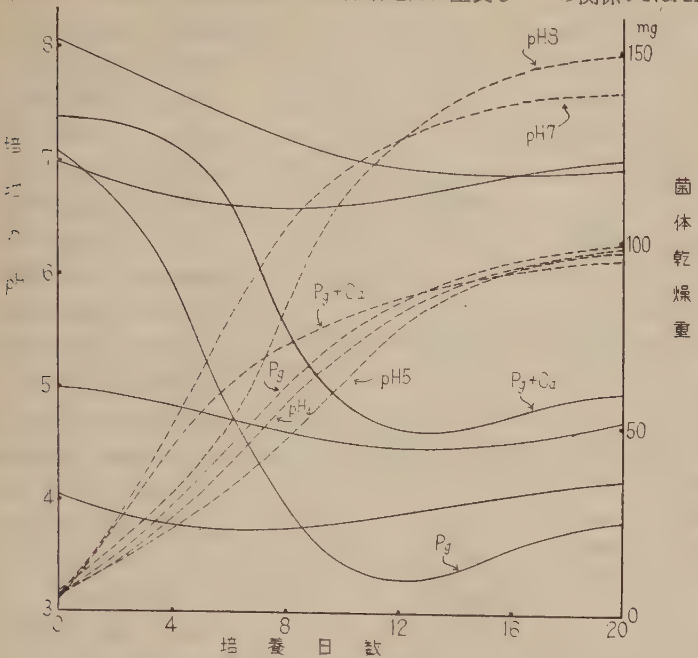
第2表 実験に用いた液体培地のN源の種類および $CaCO_3$，Na_2HPO_4 との組合せ

培地の種類	N 源				その他の成分	
	asparagine monohydrate	aspartic acid	$(NH_4)_2SO_4$	$(NH_4)_2HPO_4$	$CaCO_3$	Na_2HPO_4
a-1	+					
a-2	+				+	
a-3	+				+	+
b-1		+				
b-2		+			+	
c-1			+			
c-2			+		+	
c-3			+		+	+
c-4			+			+
d-1				+		
d-2				+	+	
p-s	sucrose 加用ジャガイモ煎汁					
p-g	glucose 加用ジャガイモ煎汁					

備考: a～b の培地の基礎成分は実験法の項に記した。
C源は 2 %量の glucose である。$CaCO_3$ と Na_2HPO_4 との濃度はいずれも 1 g/l である。

$(NH_4)_2HPO_4$ をN源とするとき，No. 11 は固体

培地ではかなりよく生長したが，液体培地では生長し



第3図　No. 13 の生長と培地の pH の変化
実線は pH，破線は菌体乾燥重，培養温度は 26°C 図中例えば pH 7 が示す破線は接種時の pH が 7 の合成培地（N源は asparagine, $CaCO_3$ 加用）における菌体乾燥重を表わす。Pg は glucose 加用ジャガイモ煎汁培地，Pg+Ca は $CaCO_3$ 加用培地である。

なかつた。この原因については明らかでない。$(NH_4)_2SO_4$ をN源とした合成培地に $CaCO_3$ と Na_2HPO_4 とを同時に加用したとき，菌体重は Na_2HPO_4 の単用よりも多かつたが，$CaCO_3$ の単用よりも少なかつた。培地の pH は培養によつていずれも酸性側に変化したが，生長量の多いものほど培養のはじめと終りとの差が少なかつた。

2)　培養条件と生長

平面培養における温度および培地の pH と生長との関係：No. 11 を用いた実験結果を第4表と第4図とに示した。菌糸は 18°C～26°C の間でよい生長を示したが，その範囲では 18°C～20°C がやや劣つていた。28°C では急に生長が悪くなり，30°C および 32°C では極めて悪かつた。37°C に6日間保つたときは死滅した。また 8°C では生存するが生長は全く認められなかつた。接種したとき pH 5.0 ないし pH 7.0 では集落の状態が大きく異なることはなかつたが，アルカリ性の培地では，pH 価が増すに従つて集落がうすくなり，色も暗緑褐色から白色へ変化する傾向を示した。以上のことからNo. 11が生長し得る温度範囲は 8°C～10°C と 32°C の間であると思われる。本実験の結果は菌糸の生長には，pH よりも温度の影響が大きいことを示しているが，最適温度は pH 5.5～7.0 の間では 26°C，pH 5.0と pH 7.5では 22°C であつた。

培地の pH と培養温度が内生胞子形成におよぼす影響をするために，次の方法によつて胞子数を算出した。各 pH および温度で 12 日間平面培養した集落の表面を白金線でこすりとり，殺菌水で充分に洗い，その洗液を4重にしたガーゼで沪過した。沪液から遠心分離した胞子を一定量の殺菌水に懸濁し，血球計算板で胞子数を測定した。20 回の測定をおこない，その胞子数を同一面積の集落に換算し第5表に示した。内生胞子の形成に対する温度と pH の影響がみとめられる。

第4表　平面培養における No. 11 の生長と温度および pH との関係

pH ＼ 温度	18°C	20°C	22°C	24°C	26°C	28°C	30°C	32°C
5.0	28mm	30mm	33mm	30mm	27mm	8mm	3mm	3mm
5.5	24	24	26	37	32	20		
6.0	24	26	28	35	33	16	4	4
6.5	29		33	33	38	26		4
7.0	24		26	37	38	12		4
7.5			31	29	28	10	4	5

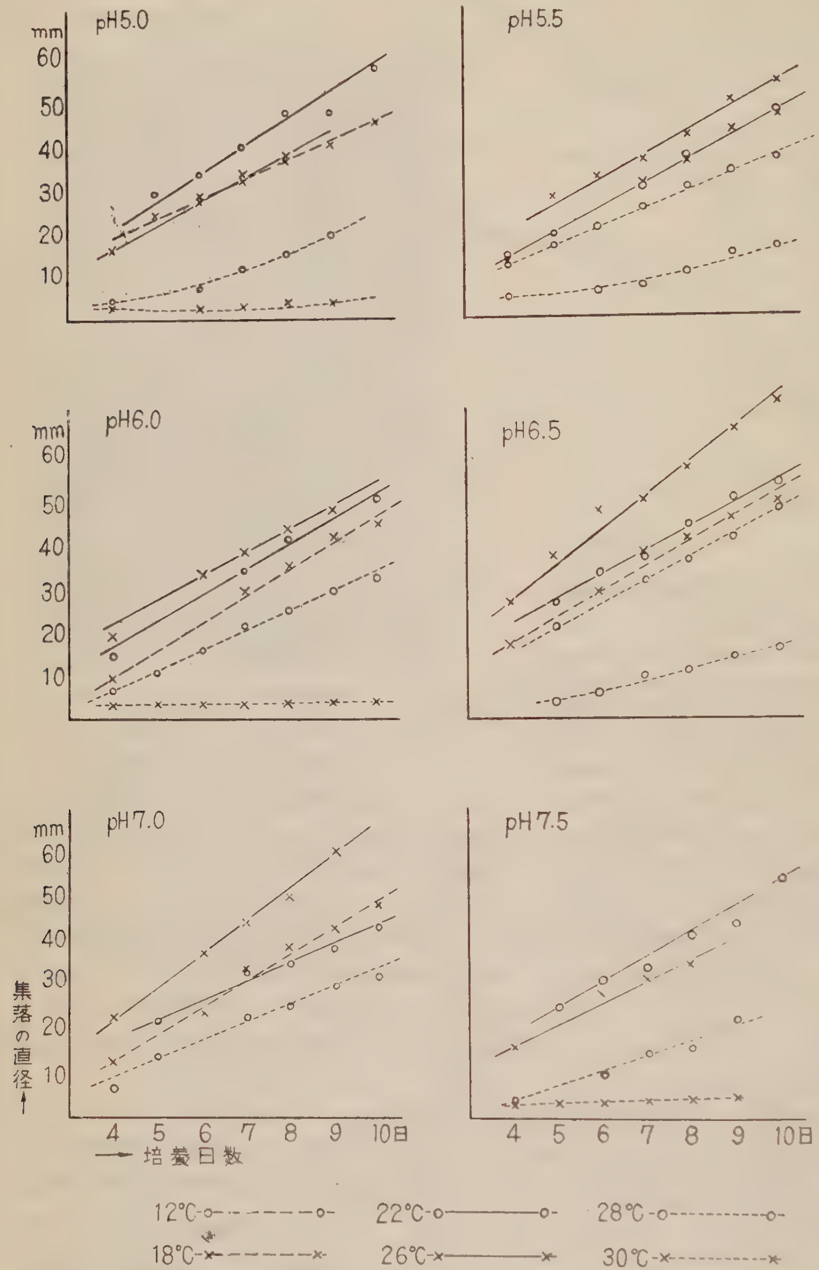
pH ＼ 温度	8°C	10°C	12°C	16°C
5.5	3 mm	3 mm	6 mm	19 mm
6.5	3	4	6	24
8.5	3	4	4	17

備考：測定値は集落の平均直径である。測定は接種後6日目におこなつた。

なお No. 1, No. 11 および No. 13 の3菌株の平面培養における生長を比較した結果を要約すると，各温度とも No. 11 は最も劣り，No. 1 と No. 13 は各 pH ともほぼ同程度の生長を示したが，高温では No. 1 が，低温では No. 13 が僅かにすぐれていた。

液体培養における温度および pH と生長との関係：sucrose 加用ジャガイモ煎汁培地でNo. 11

を 20 日間培養した結果を第6表に示した。菌体乾燥



第4図 平面培養における温度および pH とNo. 11 の生長との関係（使用した培地は sucrose 加用ジャガイモ煎汁寒天培地である）

重は平面培養における集落の直径に比較すれば，温度の影響が大きく，また温度が高いほど培養の始めと終りとの pH の差が大きくなつていた。

液体培地で培養中の pH の経時変化は，第3図と第5図に示したが，はじめは酸性側に変化し，温度によつては後期にアルカリ側に変化することがある。No. 11 では 8°C から 26°C までの間では温度が高いほど pH の変化は大きい。また培地の種類によつて pH の変化型は異なり，合成培地では少なく，ジャガイモ煎汁培地では大きく変化した。pH 価の酸性側への変化は菌の生長の最も盛んな時期に起りはじめ，菌体乾燥重の増加が頂点に近ずいた頃に上昇することが多かつた。また培養液の色が培養の経過に従つて，暗褐色を帯びることが観察された。

培地の pH の実験に緩衝液を加えることはすでに報告されている[4,5,11]。筆者も 3/50 Mクエン酸および 6/50 M第2燐酸ソーダによる緩衝液を用いたが，比較的高いイオン濃度を必要とするためか菌の生長が悪かつた。

摘 要

Thielaviopsis basicola の3菌株を用い，in vitro における菌糸の生長と胞子形成におよぼす栄養，温度および pH の影響を研究した。

1. *T. basicola* はNO_3–Nを N源とするときは全く生長しないが，NH_4–N ではかなりよく生長する。アミノ酸の多くはN源としてすぐれていた。菌糸の生長量と胞子形成量とからみれば，供試したN源のうち alanine, glutamic acid および asparagine が最もすぐれたN源であると思われる。

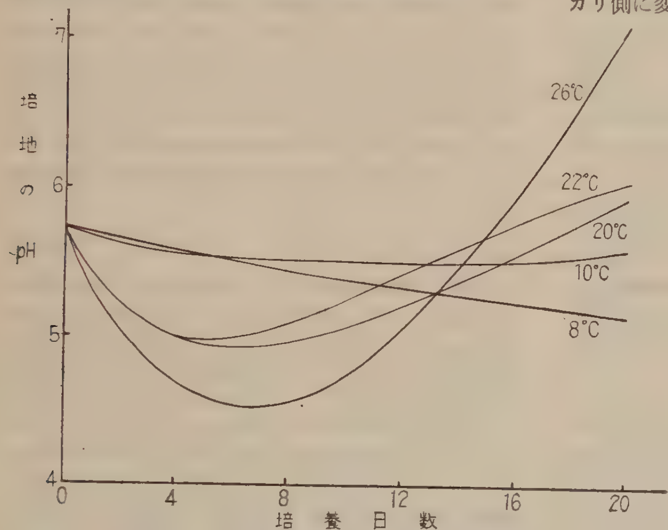
第5表　温度と pH とを異にした平面培養における No. 11 の内生胞子形成量の比較

温度＼pH	5.0	5.5	6.0
18°C	16%	26%	21%
20	——	45	59
22	14	38	72
24	44	60	100

24°C　pH6.0 の区の胞子量を 100%とする

第6表　sucrose 加用ジャガイモ煎汁培地における No. 11 の生長

培養温度		12°C		26°C			28°C
培地のpH	接種前	3.64	6.64	3.64	6.64	7.89	6.64
	培養後	3.67	5.49	3.52	5.26	5.15	5.10
菌体乾燥重		30mg	52mg	39mg	244mg	168mg	66mg



第5図　培地の pH の経時変化と温度との関係
供試菌株は No. 11, sucrose 加用ジャガイモ煎汁培地を使用した。

2.　N源が胞子形成におよぼす影響は，菌株によつて異なり，No. 13 は NH_4 の無機塩をN源とするとき多量の厚膜胞子を形成するが，No. 11 では少なく，histidine では逆の結果を示した。また leucine ではNo. 11 は相当量の厚膜胞子を形成したが，No. 13 はほとんど形成しなかつた。N源の影響は胞子の種類によつても異なり，No. 13 では NH_4 の無機塩をN源とするとき厚膜胞子が多く内生胞子が少なかつたが，有機塩では逆であつた。

3.　液体培地に Na_2HPO_4 または $CaCO_3$ を加えるといずれも生長量を増加した。両者を併用すると生長量は，Na_2HPO_4 の単用よりも増加したが，$CaCO_3$ の単用よりも減少した。合成培地のN源に $(NH_4)_2HPO_4$ を用いたとき，固体培地ではかなりよく生長したが，液体培地では全く生長しなかつた。

4.　No. 11 の生長の最低温度は 8～10°C，最高は 32°C と思われる。最適温度は固体培地では pH 5.5～7.0 のとき 26°C，pH5.0 または pH 7.5 のとき 22°C であるが，pH 5.0～7.0 で 18～26°C の範囲ではかなりよく生長する。菌糸の生長には pH よりも温度の影響が大きいが，内生胞子形成には pH の影響も大きいようである。

5.　pH は培養の始めに酸性側に変化し，後期にアルカリ側に変化することが多い。変化は培地によつて異なり，その幅は 8°C から 26°C までの温度では温度の高い方が著しい。

(1957 年 10 月 30 日受理)

引 用 文 献

1) Gilbert, W. W. : U. S. Dept, Agr. Bur. Plant Ind. Bull., 158. (1909).
2) Johnes, L. R., Johnson, J. and J. G. Dickson : Agr. Exp. Univ. Wisconsin, Res. Bull., 71:40～48. (1926).
3) Lily, V. G. and H. L. Barnett : West Virginia Univ. Agr. Expt. Sta. Bull. 362T. (1953).
4) Lucas, G. B. : Mycologia, 47: 793～798. (1955).
5) Mader, E. O. and M. M. Teller : Phytopath., 37 : 15. (1947).
6) 中村寿夫： 秦野試報, 933 : 1～51. (1934).
7) 大谷快夫：葉たばこ研究，10 : 66～70. (1956).
8) Steinberg, R. A. : Science, 107. (1948).
9) Stover, R. H. : Canad. J. Res., C. 28 : 445～470. (1950).
10) Stover, R. H. : Canad. J. Bot., 34 : 459～472. (1956).
11) White, A. G. C., R. H. Steele and W. A. Pierce, Jr. : J. Bact., 70 : 82～86, (1955).

Summary

The effects of nitrogen source, temperature and pH upon growth and spore formation of *Thielaviopsis basicola* in culture were studied. Three isolates from diseased tobacco roots, different in cultural characters, namely No. 1, No. 11 and No. 13, were used, throughout the experiment.

None of the three isolates used did utilize nitrate as nitrogen source. Asparagine and amino acids tested had a better effect on the mycelial growth than ammonium salts. Formation of chlamydospores and endoconidia of the fungus was influenced greatly by the nitrogen source. For example, $(NH_4)_2SO_4$ blocked endoconidial formation of No. 11 and 1-leucine blocked chlamydospore formation of No. 13. When inorganic salts were used, No. 13 produced many chlamydospores and few endoconidia, but organic ammonium salts affected the spore formation in the reverse. Among the compounds tested, d, 1-alanine, glutamic acid and aspararagine were considered to be the best nitrogen sources. $CaCO_3$ and Na_2HPO_4 increased the mycelial weight in liquid culture, but the latter had apparently antagonistic effect on the former.

The growth in plate cultures was good at 18-26°C. The optimum temperature for mycelial development of No. 11 was 26° C at pH 5.5-7.0, and 22° C at pH 5.0 and 7.5. Growth rate of the mycelium decreased rapidly at 28° C., and at 30° C and 32°C it became very slow; at 8° C the mycelium could not develop. At 37° C the fungus was unable to survive.

Although pH of solid medium affected the mycelial growth less than temperature, endoconidial formation was controlled by pH as well as temperature. It was often observed that pH of liquid media changed towards the acid side at first and then towards the alkaline side, which was accompanied by an increase of mycelial weight. The variation of pH was greater in liquid potato media than in synthetic media used, and when culturing temperature was between 8-26° C, variation was increasing with the temperature.

(Hatano Tobacco Experiment Station)

文 献 紹 介

Bisdithiocarbamate の殺菌機構

Ludwig, R. A., G. D. Thorn and C. H. Unwin: Studies on the mechanism of fungicidal action of metallic ethylenebisdithiocarbamates.

Canad. J. Bot., 33 (1): 42~59. (1955).

前報では nabam の通気による E. T. M の生成について述べ，これが殺菌機構を考える上に好都合であることを示唆したが，通常圃場では亜鉛，マンガン，又は鉄塩に変えて用いられているので今回はこれらについての研究を行つた。先ず硫酸亜鉛，硫酸マンガン，硫酸鉄と nabam の滴定反応を調べた。反応の推移を追求するためには光電分光光度計を使用した。その結果マンガンとの反応の場合を除き沈澱物は単一ではないことを示した。次に ethylenebisdithiocarbamic acid の3つの重金属塩の通気による影響を検討した。亜鉛塩 (zineb) は水に極めて難溶でこの水懸濁液は何等の変化を示さなかつたが稀アルカリ (NaOH) に懸濁させると急に特性的な nabam の吸収スペクトルがあらわれた。これを通気すると E. T. M. の山に変化することがみられ，*Monilinia fructicola* による発芽試験と沪液の Chloroform 抽出によつて得た結晶の確認によつて E. T. M. の生成が明らかになつた。マンガン塩 (maneb) の水溶液は直ちに nabam の吸収スペクトルを示した。通気によつて E. T. M. の山に入れかわり，この試料からも E. T. M. の結晶を得た。第二鉄塩の場合は nabam の山は存在しなかつたけれども通気によつて E. T. M. の山を確認し，Chloroform 抽出によつて黄色物質を得たが同定はしていない。沪液の ED 50 (0.09 ppm 以下) は E. T. M. 以外の殺菌物質の存在を示唆した。硫酸第一鉄でも E. T. M の山を生じた。この中で ethylenebisdithiocarbamic acid の重金属塩の通気によつて生じた E. T. M. の含量 (紫外線吸収スペクトルによる) は屢々生物検定からの推定量より低く，金属が E. T. M. の殺菌効果に影響すると思われたので E. T. M. を稀水酸化亜鉛に懸濁させたところ少量の亜鉛の存在によつて効果の増すことが明らかになり，鉄の場合も同様であつた。又 E. T. M. の Chloroform 溶液に無水硫酸第二鉄を加えて3日間烈しくかきまぜ，その沪液を濃縮して赤外線吸収スペクトルを調べた結果，或種の isothiocyanate の特性帯が認められ，硫酸亜鉛との混合でも同様な結果を得た。

以上の事実を考察して maneb と zineb はその母体である nabam が通気によつて E. T. M. を生ずるのと同じ様式で殺菌力を発現し，重金属塩は散布後の持続性を増すのに有利で，更に dithiocarbamate 自身からと同様に E. T. M. から一層強い殺菌力をもつ isothiocyanate の形成 (Van der Kerk らの持説) を促進するのであろうと結論した。

(中村広明)

馬鈴薯疫病菌の生理学的研究

第10報 紫外線照射の影響

酒 井 隆 太 郎*

Ryutaro SAKAI: Physiological studies on *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary.

Part 10. Effects of ultra-violet radiation.

I. 緒 言

馬鈴薯疫病菌についての従来の多くの研究は本菌々糸の培養並びに胞子形成の困難性を指摘している。一般に馬鈴薯疫病菌の菌糸は馬鈴薯塊茎の生切断面上ではよく生育し，また多量の胞子を形成するがこの様な培養法は屢々菌の更新を要し，また雑菌が混入し易く，種々の不便を伴う。又すでに病原性を異にする4系統が判明し，更に新系統の発生が予想されるので純粋培養菌体から接種源として用いる多量の胞子を任意に形成させることが要求される。従来本菌の胞子形成に適した培地として燕麦粉， peanut hull，馬鈴薯乾燥葉粉等を材料とした寒天培地が使用されている。又一般に胞子の形成を促進する環境条件として，紫外線照射が効果を示す場合が知られている。著者は本菌胞子形成に適する培地について研究中であるが特に紫外線の胞子の形成促進に対する効果と菌糸に及ぼす影響について実験を行つたのでその結果を報告する。

II. 実験材料及び実験方法

供試材料　供試菌は従来使用した北海道農試保存H_1菌(Race O)** 19°C で菌叢直径が 4-6cm (7～10日間培養) に達したものを用いた。

実験方法　接種源には馬鈴薯煎汁寒天培地に 19°C で 10 日間平面培養した菌叢の周縁部から内径 3mm の菌体円板を切り取つて用いた。

基本培地には菜豆寒天培地を使用した。(菜豆粉末 50g に水を加え 5～6 時間室温に放置後，約 30 分間煮沸し，沪過後 glucose 30g 及び所要量の寒天を加え，之に水を加えて 1*l* とし，稀塩酸で pH を調節)。紫外線照射は東芝電気 K. K. 製滅菌燈 (1510 A 型，ランプ GL—15×1，15W) を用いた。照射処理は無菌箱内で行い，光源と菌叢面の距離を 15cm とし，また照射に伴う温度の上昇を防ぐため，箱内に氷塊を置いて 20±2°C に保つた。照射は培養シャーレの蓋越し（間接照射）及び無蓋（直接照射）で行つた。間接照射の場合の菌体の受光波長は，予め光電分光々度計でシャーレ硝子の透過波長として求めた。又対照区の培養菌体は室温で実験室の散光の下で照射区と同時間保持した。

胞子形成量の測定法は，内径 12mm のコルクボーラーで菌叢より 4～6 枚の菌体を培地と共に切り取り，之に一定量の蒸溜水を加え充分攪拌し，その一滴をトーマ血球計算計にとり低倍率で 1.4×23mm 内の胞子数を測定，測定は1照射区当り培養菌体 5～6 個を用いその平均値を求めた。本実験は 2～3 回繰返したが大体同傾向の結果が得られた。

III. 実験結果

A. 基本培地における胞子形成

照射処理の影響を明らかにするためには，予め基本培地で，菌糸の生育，並びに胞子の形成に対する最適条件を求め，常に一定状態で培養した菌体を供試することが必要である。その主な培養条件として基本培地の稀釈度，pH，及び寒天濃度について実験を行つた。寒天濃度は 0.4, 0.6, 0.8, 1.0% (粉末寒天使用)，稀釈度は原濃度，1.5，2.5，3.0 倍，pH は 5.2，5.7，6.2，6.7，7.2，7.8 とし，それぞれについて平面培養試験を行つた。その結果を第 1，2，3 表に示す。

第1表　基本培地の寒天濃度と菌糸の生育（培養10日目）

濃度 %	菌叢直径^{mm}	空中菌糸	胞子数
0.2	33	±	1
0.4	48	+	13
0.6	49	++++	84
0.8	47.5	++++++	112
1.0	45	+++++	94

* 北海道農業試験場。

** 国際命名規約による。

第2表　基本培地の稀釈度と菌糸の生育(培養10日目)

稀釈度(倍)	菌叢直径^{mm}	空中菌糸	胞子数
1.0	48	＋＋＋＋＋＋＋	143
1.5	56	＋＋＋＋＋	31
2.0	47	＋＋＋	3
2.5	44	＋	1
3.0	47	＋	0

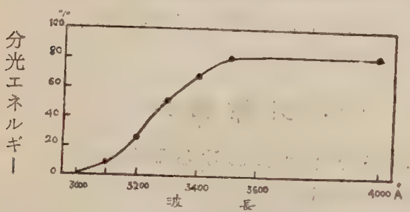
第3表　基本培地の水素イオン濃度と菌糸の生育(培養10日目)

pH	菌叢直径^{mm}	空中菌糸	胞子数
5.2	50	＋＋＋＋＋	26
5.7	53	＋＋＋＋＋＋	99
6.2	55	＋＋＋＋＋	183
6.7	58	＋＋＋＋＋	97
7.2	45	＋＋＋	6
7.8	45	＋＋＋	9

即ち基本培地における本菌々糸の生育及び胞子形成の最適条件は，寒天濃度，0.8%，pH 6.2，稀釈度原濃度である。よつてこれに基ずいて基本培地を調製し一定期間培養した菌体を実験に供した。

B. 紫外線照射

直接，間接照射処理における菌体の受光紫外線波長を次の様にして求めた。使用紫外線燈は 1850～5780Å 間の各波長を有しその分光エネルギーの大部分は2573Åであるから直接照射では菌体は 1850Å ～5780Å 間の波長を受ける。



第1図　使用シャーレ蓋通過紫外線波長

間接照射では，シャーレ硝子通過紫外線波長は第4図に示す様に 3100Å 以上であり，従つて処理菌体は 3129Å～5780Å 間の波長を受ける。

a. 菌糸に対する影響　本菌々糸及びその生育に対する紫外線照射の影響を直接，間接照射について観察した。

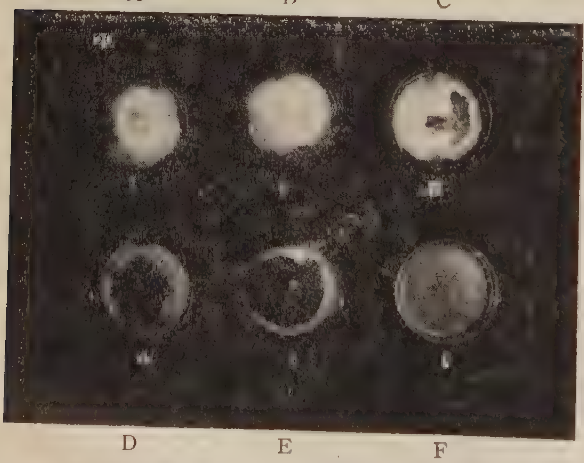
直接照射の場合：照射距離 15cm，照射時間は 0，1，1.5，2.5，3，5 分で，照射 20 時間後の菌体を観察した（第2図参照）。菌糸に対する影響をみると 1.5 分間の照射で明らかに空中菌糸の一部分が培地上に倒伏し始め照射時間の増加に伴って倒伏面積は拡大し，遂に 5 分間照射では空中菌糸は完全に認められない。この様に倒伏した空中菌糸を検鏡すると菌体の細胞原形質は全く gel 化して枯死状態を呈する。また 1 分間照射菌体は外観特に著しい変化は認められない。併し照射時間 30 秒で空中菌糸はその先端に水滴を生じ，1 分以上になるに従つてその量を増加するのが認められた。なお 10 秒間照射を 2 日間にわたつて 2 回行つた結果，空中菌糸の生育がやや阻害される傾向が認められた。

第4表　菌糸の生育に対する間接照射の影響

照射後の日数 / 照射時間(分)	菌叢直径^{mm}		
	1～4	4～6	6～8
0	19	14	16
5	18	14	16
10	20	13	16
20	20	16	19
30	20	14	18

間接照射の場合：照射距離 15 cm，照射時間 5，10，20，30 分で照射 20 時間後の菌体に対する影響を観察した結果，この実験の範囲では何れも空中菌糸には異常は認められなかつた。又照射後の菌体の生育に対する影響については第4表に示す如く各処理区とも菌体の生育には明らかな相異は認められなかつた。なお 6 時間の連続処理でも菌糸に特に明らかな影響は認められなかつた。

A　B　C



D　E　F

A. 対照区
B. 1分
C. 1.5 分
D. 2.5 分
E. 3分
F. 5分

第2図　菌糸に対する紫外線直接照射の影響

b. 胞子形成に対する紫外線の影響　培養 7～10 日目の菌叢に紫外線を照射し一定時間後の胞子形成量を無照射区のそれと比較した。照

射距離は 15cm，照射時間は直接照射では 5，10，20，30，60秒，間接照射では 1，5，10，20，60 分である。照射後の胞子形成量の測定は48時間後に行なつた。結果を第 5，6 表に示す。表中の数字は$\frac{照射区胞子数}{対照区胞子数}$比である。

直接照射の場合は照射時間 5 秒で胞子の形成の促進が認められ，10 秒では最も胞子形成を促進した。しかし時間が更に増加すると反対に胞子形成は阻害され，30 秒以上では減少する傾向を示した。なお胞子形成を阻害する照射時間は略菌糸に異常が認められた照射時間とほぼ一致する。なお照射によつて促進される胞子形成量は照射時における菌体の age に関係する様である。

第 5 表　胞子形成に対する直接照射の影響

照射時間(秒) ＼ 実験回数	I	II	III
5	1.07	1.24	—
10	1.41	1.27	1.8
20	—	1.07	1.5
30	0.44	1.04	—
60	0.31	0.91	0.65

第 6 表　胞子形成に対する間接照射の影響

照射時間(分) ＼ 実験回数	I	II	III
1	1.08	—	—
5	1.44	2.18	1.34
10	1.92	2.22	1.28
20	2.17	0.90	0.63
60	1.15	—	—

間接照射の場合は第 6 表のように大体照射時間 5～10 分間で比較的胞子形成の促進が，30 分以上では抑制が認められた。なお照射後の時間の経過に伴う胞子形成量を，5 及び 10 分照射区で測定し，第 7 表に示す結果を得た。

第 7 表　照射後の時間(日)の経過に伴う胞子形成量

照射時間(分) ＼ 照射後の日数	2	4	7
5	1.97	2.64	1.28
10	2.82	2.52	1.04

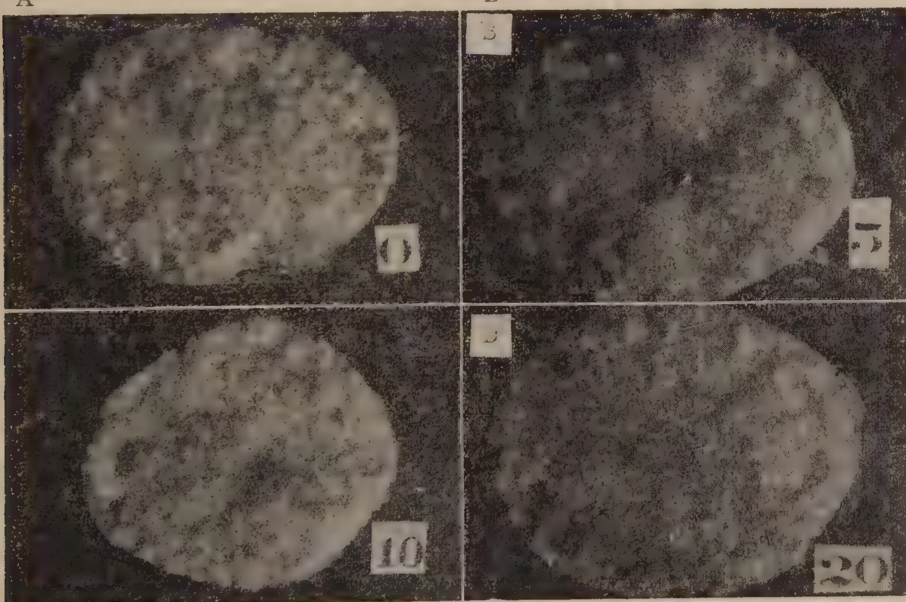
之によると 10 分照射は 5 分のものに比し 2 日後の胞子形成量は大きいが 4 日後のそれは略々 5 分と同程度となる。又 7 日後ではすでに最大生長に達したため形成胞子量は対照区のそれと大差なくなる。即ち或程度の照射時間の増加は照射処理後胞子形成迄の時間を短縮する様である。

c. 病原性と紫外線照射の関係　本実験照射紫外線の本菌の病原性に対する影響を知るため直接照射区（対照 (0)，5，10，20秒）の一定面積の菌体を切りとり之に一定量の水を加え胞子の懸濁液を作り，馬鈴薯塊茎（農林 1 号）の切断面に一定量接種し 19°C 4 日間保つた。第 3 図の如く各照射処理区とも病原性を有し塊茎上の菌糸量は10秒照射区で最も多く次いで 5 秒区，対照区，20秒区の順となり直接照射における胞子形成量と塊茎上の菌糸量は大体平行することが示された。

IV. 考　察

菜豆寒天培地に一定期間培養

A　B



C　D

第 3 図　照射菌体が形成した胞子による塊茎の罹病状況
A. 対照　B. 5 分間照射区　C. 10 分間照射　D. 20 分間照射区

した馬鈴薯疫病菌に対する紫外線照射の影響は菌糸の状態及び胞子形成に認められ，特に照射時間，照射紫外線波長の差によつて異るが，菌糸に対しては空中菌糸において影響が著しい。即ち波長1850Å～5780Åでは照射時間 30 秒で空中菌糸は異状を呈し，1.5 分間でその一部分は倒伏しはじめ，照射時間の増加に伴つて倒伏面積は増大し，空中菌糸は全く枯死するが，この様な空中菌糸の障害は他の植物病原菌においてDiener[3]，Stevens[2] がこれと略同様の結果を報告している。しかし 3129 Å～5780Å間の波長では 6 時間の照射でも特に明らかな影響はない。

Bovie[1] は多くの糸状菌が 2925 Å以下の波長で阻害されることを示したが，本実験使用の波長の大部分は 2537 Å であつて，本菌々糸の阻害は主に本波長によつて起ることが予想される。Dufrenoy[4] は *Blepharospora* の胞子が紫外線によつて cytolysis を起すことを報告したが，本菌の場合も菌糸原形質の gel 化が認められた。

本菌の胞子形成に対する紫外線照射の効果は直接照射より間接照射処理が勝る。即ち 3129Å～5780Å 波長を用いて最も胞子の形成を促進した。なお他の多くの植物病原菌では胞子形成を促進する波長が 2300Å～2800 Å の範囲にあるが，本実験に用いた波長は 1850 Å～5780Åで菌糸に対する阻害の影響が大きく，胞子形成に対する効果も少なかつた。しかしこの場合は照射 10 秒間で最も胞子の形成を促進する。これは *Stemphylium solani* の胞子形成が 3120Å～5460Å の波長で促進される場合と略一致する。

V. 摘　要

1．この報告には馬鈴薯疫病菌に対する紫外線照射の影響，特に胞子の形成について行つた実験結果を記した。紫外線波長は 3129 Å～5780Å（間接照射）及び 1850Å～5780Å（直接照射）で，照射距離は 15cm である。

2．菌糸は直接照射では 30 秒照射によつて異常を認め，90 秒で空中菌糸の 1 部が枯死し，照射時間の増加に伴い被害面積が拡大する。間接照射の場合は特に明らかな影響は認められない。

3．胞子形成は直接照射では 5～10 秒，間接照射では 5～10 分の照射によつて最も促進されたが，その効果は後者において大である。

4．本実験の範囲内では紫外線処理により病原性に変化を認めなかつた。 (1957 年 6 月 25 日受理)

文　献

1) Bovie, W. T. : Bot. Gaz., 61: 1～29. (1916).
2) Dickinson, S. and Margaret, A. : Nature, 163: 32. (1948).
3) Diener, U. L. : Phytopath., 45 : 141～145. (1952).
4) Dufrenoy, J. : Rev. Path. Veg. Entmol. Agric., 12: 270～271. (1925).
5) 堀　正侃 : 病虫害雑誌, 22 :15～23. (1935).
6) Mccllan, E.O. : Boyce Thompson Inst., 13 : 323～336. (1944).
7) Ramsey, G. B. and Bailey, A. A. : Bot.Gaz., 89: 113～136. (1930).
8) 酒井隆太郎 : 北農試彙報, 68 : 63～66. (1955).
9) ―――― : 日植病報, 19 : 141～145. (1955).
10) ―――― : 北農試彙報, 71 : 51～55. (1955).
11) Snieszko, S. F. Carpenta, J. B., Lowe, E. P. and Jacob, J.G. : Phytopath., 37 ; 635～649. (1947).
12) Stevens, F. L.: Bot. Gaz., 86 : 210～225. (1928).
13) 高桑亮・高瀬昇・富山宏平 : 日植病報, 19 :114～116. (1955).

Résumé

The purpose of the present experiments was to make clear the effects of ultraviolet on the aerial mycelium and spore formation of *Phytophthora infestans* in bean meal agar. The fungus used in this study was common strain of *P. infestans* Race O, isolated in 1954 from naturally infected Irish Cobbler at Kotoni in Hokkaido. The source of ultraviolet radiation was a Tôshiba sterilamp with a GL-15×1 lamp which gave off rays from 1850 to 5780 Å, and little rays of wave length below 3000 Å were transmitted by the petri dish glass.

Plate cultures with (direct radiation) or without (indirect radiation) covers were exposed for varying periods of time at a distance of 15 cm from the energy source.

Direct radiation with rays of wave lengths 1850-5780Å, resulted in decreased growth rate for 30 seconds and lethal effects to aerial mycelium for 60 seconds.

Indirect radiation, exposures for from 5 minutes to 6 hours, with rays of 1850-5780Å had no detrimental effect on the fungus.

The spore formation of the fungus appeared to be most richest in direct radiation for 10 seconds and indirect radiation for 5-10 minutes, but direct radiation produced effects like those given by much weaker indirect radiation. (Hokkaido Nat. Agr. Exp. Sta.)

西瓜蔓割病の病理化学的研究

第5報 蔓割病菌の代謝生産物に就いて (其の1)*

西 村 正 暘**

Syoyo NISHIMURA: Pathochemical studies on watermelon wilt.(Part 5).
On the metabolic products of *Fusarium oxysporum* f. *niveum*
(E.F. Smith) Snyder et Hansen. (1)

先に本病菌〔*Fusarium oxysporum* f. *niveum* (E.F.S.) S. et H.〕の培養沪液から一萎凋毒素として phytonivein を単離し[6], その in vitro 並びに in vivo における代謝生理[7], 各種の生育阻害作用[6]及びその作用機構などについて報告した。なお本菌の pectin 質分解酵素 (主として depolymerase) の作用の重要性については, 感染組織の軟弱化乃至崩壊現象との関連を指摘した[16]。

本実験では, phytonivein 以外に培養液中に分泌されている物質中, 西瓜植物の萎凋に多少なりとも関与しそうな物質の検索を試み, 新しく fusarin 酸を見出し得た。本報文では本菌による fusarin 酸の in vitro 並びに in vivo における代謝生理及び fusarin 酸の微量定量法などについても論及を試みた。

本実験の大要は先に昭和 31 年度日植病大会で発表した[20]。

本実験中終始御指導戴いている広江勇教授並びに fusarin 酸の標品を分譲下さつた新潟大学玉利勤治郎教授に対して感謝の意を表する。

II. 実験結果

A. 有機酸類について

i) 揮発酸の検索: 培養沪液 (Richards 氏液体培地で 28°C., 20~25 日間培養したもの, 以下すべて同じ) を硫酸酸性下で水蒸気蒸溜を行い, その溜液に $Ba(OH)_2$ 液を注加し生ずる Ba-塩を沪別した。後 Ba-塩は稀硫酸で分解し, エーテル振出して, エーテル層に有機酸を移行せしめた。エーテルを溜去すると, 淡黄色の濃縮残渣が得られたが, これは強い酢酸臭があり, 明らかに酢酸の存在を示していた。次のその一部を Na-塩として蟻酸の反応を試みた。即ち昇汞液を加えて加熱すると還元により甘汞の白色沈澱を生じ, 又硝酸銀液を滴下すると蟻酸銀と思われる灰白色沈澱を生じ, 加熱によつて黒変して金属銀の遊離を見た。以上のことから酢酸並びに蟻酸の存在が確認されたが, paper chromatography の結果 (Na 塩として 1.5 N-NH_4OH 添加 BuOH 液を展開剤として行つた) は酢酸の方が量的に多いことを示していた。

ii) 不揮発酸の検索: 先ず培養沪液を減圧下 (50~55°C) で濃縮し, MeOH で除蛋白後, エーテルで 2 日間連続抽出を行つた。エーテル抽出液は芒硝脱水後濃縮乾固し, 石油エーテルで可溶部と不溶部とに分別した。先ず不溶部はこれを paper chromatography ($BuOH \cdot AcOH \cdot H_2O$, 4:1:1) で展開後 0.1% BPB EtOH 液で発色させると 4 個の spot が認められた。その中 1 個 (Rf=0.75~0.77) は非常に明瞭に, 後の 3 個は稍々不明瞭であつた。既知有機酸の Rf と対照した結果 (第1表), それらはコハク酸, 蓚酸, リンゴ酸及び未確認酸であることが判つた。

第1表 不揮発, エーテル可溶酸類の検索

Tab. 1. Paper chramotographic Rf. values of non-volatile, ether soluble organic acid in the culture filtrate.

No. of spots	Sample		Pure organic acid			
	Rf	Intensity of spot	Oxalic	Malic	Succinic	Fusaric
1	0.24~0.25	++	0.25~0.26			
2*	0.46~0.47	±				
3	0.49~0.51	±		0.49~0.50		
4	0.75~0.77	+++			0.74~0.76	
5	0.85~0.87	+++				0.85~0.87

*: undetermined

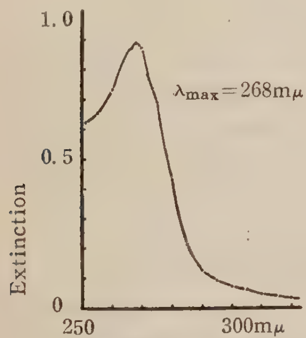
iii) fusarin 酸の分離: 別に石油エーテル可溶部はこれを濃縮乾固後, 熱リグロインから再結を繰返えすと融点 107~108°C の無色柱状結晶が得られた (収量約 34 mg/10 liter)。純粋な fusarin 酸と混合しても融点の降下は見られず, 又紫外線吸収スペクト

* 農作物病害の病理化学的研究 (邦文編) 第VII報 (鳥取大植病)

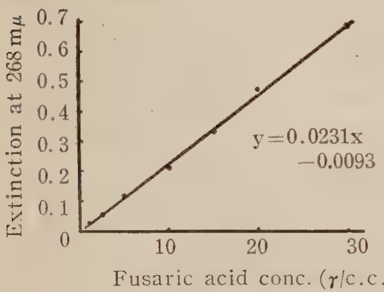
** 鳥取大学農学部

ル曲線（第1図）も文献値[28]と一致したので fusarin 酸と同定した。

iv) fusarin 酸の微量定量法：第1図でfusarin 酸は 268 mμ に極大吸収のあることが判つたので，その波長における fusarin 酸濃度とそれ等の吸光度との間の検量線を求めた処，第2図のようによく Lambert-Beer の法則に従うことが判つた。この実験後 Zähner 氏[28]の報文に接したが殆ど一致することを知つた。



第1図　フザリン酸の紫外線吸収スペクトル
Fig. 1. Ultra-violet absorption spectrum of fusaric acid.

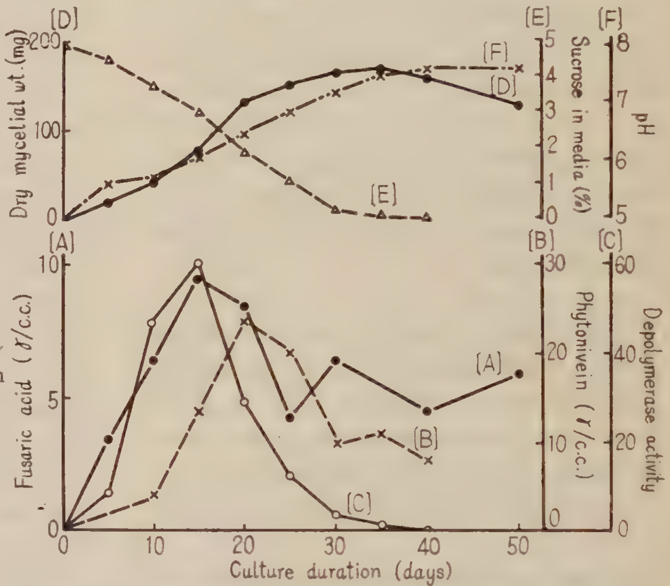


第2図　フザリン酸濃度と吸光度との間の検量線
Fig. 2. Calibration curve between fusaric acid conc. and these extinctions at 268 mμ.

次に furarin 酸の paper chromatography を BuOH・AcOH・H_2O (4:1:1)，東洋沪紙 No.2 を用いて行つた処，Rf. 0.85〜0.87 に展開されることを知つた（尚 BPB 液を spray した場合，黄色点とならず数分後に赤色点を生ずる）（第1表）。最近 Zähher 氏[28]は BuOH・H・COOH・H_2O (75:15:10) で Rf 0.83〜0.85 を，又 Kalyanasundaram 及び Venkata Ram 両氏[18]は fusarin 酸の抗菌性を利用して（展開剤は筆者と同様）Rf 0.87〜0.88 を得ている。実験法で多少の差があるので3者の完全な一致は帰し難いと思われる。

以上の実験結果から fusarin 酸の定量法の可能性が考えられたので以下その応用に関する実験例について述べる。

v) in vitro 並びに in vivo における本菌の fusarin 酸代謝：第3図は本菌の培養日数と fusarin 酸の生産量との関係を調べたものである。即ち 100 cc 内容 flask に Richards 氏液を 25 cc 宛分注し，28°C で培養した。一定日数後取出し，菌体を沪別後，沪液は MeOH で除蛋白してエーテル振出を行つた。その抽出エーテル液は濃縮乾固し，ついで

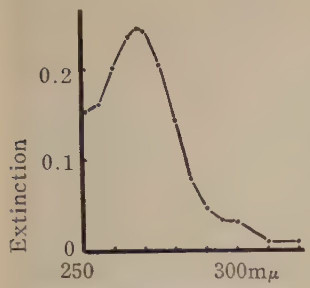


第3図　培養日数とフザリン酸生産量との関係
Fig. 3. The growth curve of the fungus on Richards' medium, and the appearances of fusaric acid, phytonivein and depolymerase in the culture filtrate as a function of time.

石油エーテルに転溶後，前述のように paper chromatography にかけ，その Rf 相当部を 95%EtOH で溶出した。そして各々の吸光度を求めて第2図から fusarin 酸量を換算したものである。

先に報告した phytonivein[7]や depolymerase[16]の生産量と同様に，菌発育の旺盛な時期に生産量大で，其の後自己消化につれて次第に減少していく傾向が認められた。

次に同様な方法によつて，蔓割病罹病西瓜の病患部から fusarin 酸の fraction を得，これの紫外線吸収スペクトル図を調べて見ると（第4図），やはり 268 mμ に極大吸収が求められ，所謂 vivo-toxin[1,8,25]として本病発病の進展に何らかの作用をなしているものと想像される。



第4図 蔓割病病患組織からのフザリン酸の検出
Fig. 4. Detection of fusaric acid in the diseased tissue.

最近 Kalyanasundaram 氏ら[13]も棉萎凋病の病患部から，fusarin 酸の抗菌性を利用してその存在を確認し，又トマト萎凋病の場合でも，Sanwal氏[24]によつて同様な事実が予測されている。

更に本病菌の保菌土壌中からの fusarin 酸の検出を行つてみた。即ち砂質土壌に連続3回西瓜幼植物を密植して発病させ，感染能力において充分本菌が繁殖したと思われる土壌 50g を採取し，これを約 200cc の熱水で反復抽出した。後抽出液は遠沈して上澄液を集め減圧濃縮後，以下は前記同様な処理を行つた。その結果 80γ/50g 即ち 1.6γ/1gram soil という値が得られた。併しこの値には土壌中に残存した被害細根中の fusarin 酸も含まれていると思われ余り正確は期し難い。Kalyanasundaram 氏[10]も棉の萎凋病菌について同様な調査を行つて 7.90γ/1 gram soil を得ているが，氏の実験では flask 中に土壌と燕麦を入れて菌を接種し，28～32°C で2週間後のものについて行つているので真の土壌とはいい難い。併しいずれにせよ保菌土壌では fusarin 酸の蓄積ということも考えられる。

B. 遊離アミノ酸類

培養沪液を減圧下 (50～55°C) で約 1/3 に濃縮後 EtOH を加えて生ずる沈澱を先ず遠沈除去した。ついで EtOH を溜去し，同量のクロロホルムで2回振出洗滌後,その水層は更に濃縮して paper chromatography の供試液とした。そして phenol (3%NH_3添加)並びにBuOH・AcOH・H_2O (4:1:5) で展開し，常法によつて Ninhydrin で発色させた。結果は第2表の如くである。

第2表 遊離アミノ酸の検出
Tab.2. The free amino acids in the culture filtrate

Amino acid	Intensity of spot
Aspartic acid	卌
Glutamic acid	卌
Alanine	++
Glycine	+
Proline	+
Asparagine	±
Undetermined	±

Flück 及び Richle 両氏[2]もまたトマト萎凋病菌について同様な実験を行つているが，やはり asparagin 酸，glutamin 酸が他に比して多いことを見ている。

C. アルコール並びにアルデヒド類

培養沪液を $CaCO_3$ で中和後，冷却器2個連結して水蒸気蒸溜を行つた。溜出液は一度沪過後（稍々多量の黄色物質の溜出のため）2・4-dinitrophenylhydrazine で hydrozone として沈澱を得た。再結により融点 148～9°C の黄色針状結晶を得たが，その量が少ない為物質の同定までには至らなかつた。尚蒸溜により極少量乍ら EtOH の存在が認められた。(0.5～0.8%)

D. 萎凋に関与する酵素類

本菌の分泌する pectin 質分解酵素は本病の発病に際して，寄主組織の軟弱化乃至崩壊作用に関与するものとして先にその重要性を指摘し[18,19]，更に培養沪液中の本酵素は polygalacturonase や pectin-methylesterase は殆ど含まれず大部分が粘度低下のみに関与する depolymerase から成つていることを報告した[16]。

また導管の褐変に関与する polyphenol 類の precursor の分離，その存在意義或は β-glucosidase 活性に就いても調査したがこれらに関しては後報にゆずる。

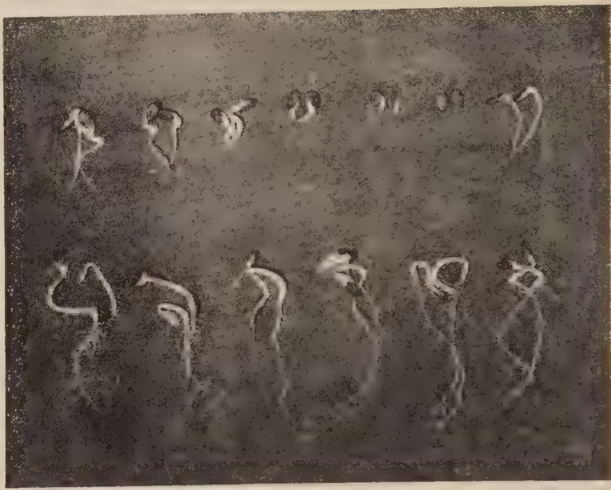
III. 考 察

fusarin 酸は最初藪田氏ら[27]によつて稲馬鹿苗病菌から分離されたが，近年に至りトマト萎凋病菌[3,4]，甘藷蔓割病菌[14]並びに棉萎凋病菌[9]などの *Fusarium* 属菌からも見出されるに至つた。他方その合成も行われている[22]。

fusarin 酸の定量法についても近時 fusarin 酸の生理作用の実験上の必要性から 2，3 の試みがなされたが，筆者の行つた方法との比較をしてみると，最近 Kalyanasundaram 氏[9]は fusarin 酸の抗菌性を利用して，その阻止円直径と fusarin 酸濃度の対数値とが直線関係になることを見出し，agar-cup 法と名付けてその定量に応用している[11,12,13]。しかしこの方法では生物試験であるため，供試細菌，測定条件或は測定試料液により誤差を生じ易く且つ操作が複雑となることが推定される。次に筆者の実験終了後に接した Sanwal 氏[24]の方法では試料液を paper-chromatography で展開後その Rf 部を EtOH 溶出する所までは筆者の方法と殆ど同じであるが，氏はその後その溶出液について Pepkowitz 及び Shive 両氏[21]の Kjeldahl 法で N の定量を行い，その値を以て fu-

sarin 酸中の N 量としている。その点筆者の方法は Rf 部から溶出後直ちにその吸光度を測定するだけで足りるので迅速且つ正確ではないかと思われる。

fusarin 酸の植物細胞に及ぼす生理作用[5,15,23]やその作用機構[26]などは既に諸氏により詳細に研究されている。西瓜で調べて見ると約 2×10^{-4} 液まで葉では veinal necrosis が，茎或は葉柄では browning collapse が見られる（第5図）（しかし培養沪液では第6図の如く leaf edge necrosis となり fusarin 酸単独の場合と稍々異なる）。また西瓜種子の発芽に対しては高濃度（約 10^{-4}液）では発芽抑制，低濃度では寧ろ促進効果が見られる（第7図）。



第7図 西瓜種子の発芽に及ぼす fusarin 酸の影響

Fig.7. Effect of fusaric acid upon the germination of watermelon seeds.
top: from left, 2×10^{-5}, 4×10^{-5}, 10^{-4}, 1.3×10^{-4}, 2×10^{-4}, 4×10^{-4}, cont.
bottom: from left, 10^{-6}, 1.3×10^{-6}, 2×10^{-6}, 4×10^{-6}, 10^{-5}, 1.3×10^{-5}



第5図 fusarin 酸による西瓜葉細胞の壊死

Fig.5. Veinal necrosis in watermelon leaves and necrotic collapse in the petioles caused by fusaric acid compared with the control (right).



第6図 培養沪液による西瓜葉細胞の壊死

Fig.6. Leaf edge necrosis caused by the culture filtrate.

本報文によつて，本病菌の代謝物質中，西瓜植物に有害に作用し，且つ蔓割病の発病に際して関与しているものとして phytonivein, pectin 質分解酵素の他に新たに fusarin 酸を推定することが出来た。

IV. 摘　要

(1) 西瓜蔓割病菌の培養沪液中の代謝物質を検索した結果，有機酸類としてコハク酸，リンゴ酸，蓚酸，蟻酸，醋酸，fusarin 酸並びに未確認酸が，遊離アミノ酸類として glutamine 酸，asparagin 酸，alamine, proline 並びに，glycine また ethanol, 1種の aldehyde などが検出或は分離出来た。

(2) fusarin 酸の微量定量法により，培養液中えの分泌量，本病罹病西瓜また保菌土壌中からの検出を行つた。

(3) 本菌の代謝物質のうち，本病の発病に直接的に関与するものとして，先に報告した phytonivein 並びに depolymerase の他に新しく細胞毒としての fusarin 酸を加えた。（1957 年 8 月 25 日受理）

引 用 文 献

1) Dimond, A.E. and P.E.Waggoner: Phytopath., 43: 229~235. (1953).
2) Flück, V. and K.H.Richle: Phytopath. Z., 24: 455~461. (1955).
3) Gäumann, E., St. Naef-Roth and H.Kobel: Ibid., 20: 1~38. (1952).
4) ———— · - and : C.r. Ac. Sc., Paris: 234~174. (1952).
5) ———— · P.Reusser and A.Ammann: Phytopath. Z., 19: 160~220. (1952).
6) 広江勇・西村正暘: 日植病報, 20: 161~164. (1956).
7) ——— · ———: 日農化誌, 30: 528~531. (1956).
8) Kakshminarayanan, K. and D.Subramanian: Nature: 697~698. (1955).
9) Kalyanasundaram, R.: Jour. Indian Bot. Soc., 34: 43~46. (1955).
10) ————: Curr. Sci., 24: 310~311. (1955).
11) ————: Proc. Indian Acad. Sci., B, 41: 117~122. (1955).
12) ———— and L.Sarathwathi-Devi: Nature, 175: 945. (1955).
13) ———— and C.S. Venkata Ram: Jour. Indian Bot. Soc., 35: 7~11. (1956).
14) 宗像桂: 日農化大会 1952 年講演
15) Naef-Roth, St. and P. Reusser: Phytopath. Z., 22: 281~287. (1954).
16) 西村正暘: 鳥取農会報, 11: 42~46. (1956).
17) ————: Ibid., 11: 137~142. (1957).
18) ————: 農業技術, 11: 343~346. (1956).
19) : 農園, 31: 1607~1610. (1956).
20) ———— · 広江勇: 日植病報, 21: 113. (1956).
21) Pepkowitz, L.P. and J.W.Shive: Ind. Eng. Chem., 14: 914~916. (1942).
22) Plattner, P.A., W.Keller and A.Boller: Helv.Chim.Acta, 37: 5. (1954).
23) Reusser, P. and St. Naef-Roth: Phytopath.Z., 26: 271~296. (1956).
24) Sanwal, B.D.: Ibid., 25: 333~384. (1956).
25) Subramanian, C.V.: Curr. Sci., 24: 144~147. (1955).
26) 玉利勤治郎・加治順: 日農化誌, 26: 223~227, 295~298, 298~303, 345~349, 349~353; 27: 245~249, 249~252, 302~306. (1952~1953).
27) 藪田貞治郎・神戸勝二, 林武: Ibid., 10: 1059~1068. (1934).
28) Zähner, H.: Phytopath. Z., 22: 227~228. (1954).

Résumé

From the detections of the metabolic products in the culture solution upon which *Fusarium oxysporum* f.*niveum*, the cansal fungus of watermelon wilt was grown, the existence of the following substances were recognized:—succinic, malic, oxalic, formic, acetic, fusaric (ca. 34 mg./10 liter) and an unknown as organic acid, and glutamic acid, aspartic acid, alanine, proline and glycine as free amino acid, ethanol and undetermined aldehyde.

By applying paper chromatography (Rf=0.85~0.87, with BuOH·AcOH·H_2O, 4:1:1) and determining ultra-violet ray absorption (calibration curve between fusaric acid concentrations and these extinctions at 268 mμ=λmax.), the present new technique for the quantitative evaluation of fusaric acid was established, as shown in the following procedure:—the culture filtrate was continuously extracted for 48 hrs. with ether. The ether solution obtained was dried up and then extracted repeatedly with petroleum ether. All the extract, after concentration, was run on Toyo filter paper No. 2 with the solvent noted above. After drying, the position of fusaric acid was cut and eluted with the limited amount of 95% EtOH. Lastly, using Beckmann spectrophotometer, the amount of fusaric acid in the eluted EtOH sol'n. was calculated.

The modification of this method to find out the existence of fusaric acid in the diseased host tissues in vivo and in the soils infected with the causal fungus were applied, and all the positive results were obtained as well as in the media.

Thinking from the experiments mentioned above, the author added newly fusaric acid, besides phytonivein[6,7,16] and pectic enzyme [16,19] reported previously, as metabolic substances being responsible for the disease development (Lab. of Phytopathology, Fac. of Agriculture, Tottori University)

日本におけるカボチャ・モザイク病に関する研究

II. バイラスの物理的性質，同定及びトウガ，シロウリ，スイカのモザイク病株から分離されるバイラスとの関係

小 室 康 雄*

Yasuo KOMURO: Studies on a mosaic disease of squash in Japan. II. Physical properties and identification of its causal virus, with special reference to the relationship to the virus from mosaic plants of white gourd, oriental pickling melon and watermelon.

1. 緒 言

著者は前報告[12]で関東地方にカボチャ・モザイク病の発生が多いこと，本病は汁液接種によつて容易に伝搬される1種のバイラスによるものであること，ワタアブラムシ，モモアカアブラムシによつて媒介されるが，ウリハムシによつては媒介されないこと，種子伝染は品種によつては低率ではあるが認められることなどを明らかにした。更に25科73種の植物に汁液接種した所，感染のみられたものはウリ科植物及びアカザの2科10種の植物にすぎず，この結果から本バイラスは寄主範囲の狭いバイラスであることを示した**。

本実験においては，このバイラスの物理的性質を調べ，前報の結果とあわせて既知のウリ科植物を侵す諸バイラスと比較し同定を行うことにした。また先に自然でモザイク症状を呈している株からキュウリ・モザイク・バイラス（CMVと略記する）の分離を行つた際[14]，ウリ科植物のうちCMVの分離されなかつたトウガ，シロウリ，スイカのモザイク・バイラスはこのカボチャ・モザイク・バイラスと同一又は近縁なものではないかとの疑いをもつていたので，数種植物に対し，これら諸バイラスと本バイラスとを交互接種してみた。これらの結果をここに報告する。実験は1950～53年に東京大学農学部ガラス室内で行つたものである。実験中，終始懇切な指導をいただき，論文を校閲下さつた明日山教授にここに厚く感謝する。

2. 実験材料及び方法

供試カボチャ・モザイク・バイラスはいずれも前報[12]と同じものである。汁液接種にはカーボランダム法を用い，物理的性質を調べるに当つての操作も常法に従つた。トウガ，シロウリ，スイカのモザイク株の採集についてはその項で述べることにする。供試植物の管理，アブラムシ防除などはすべて前報に準じて行つた。

3. 実 験 結 果

A. バイラスの物理的性質

汁液接種によつて発病した西洋カボチャ（黒皮甘栗）の病徴のよく出ている上葉を切りとり，その生体重の10倍の蒸溜水を加え磨砕した後，ガーゼで病汁を絞り出し，これを10倍稀釈液として各処理に用いた。検定植物としては始めアカザを用いその local lesion によつて調べようとしたが，アカザの lesion 形成が個体及び環境などの差によつて必ずしも確実とは言えないので，西洋カボチャ（黒皮甘栗）を用い，その全身感染の有無によつて調べた。その結果を第1表に示す。第1表の結果をみると実験区によつて多少の相異はあるが，ほぼ耐稀釈性は 500～1,000 倍，耐熱性は 50～55°C，耐保存性は5～10日の範囲内にあるものといえよう。

B. 本バイラスとCMVとの交叉免疫試験

前報の汁液接種による寄主範囲，上述の物理的性質などから考察して，本バイラスはCMVとは別種のバイラスであると推定される。同一の植物に2種のバイラスが侵入した場合，それらが同種のバイラスであると互に干渉或は拮抗して交叉免疫現象がみられることが既に知られている。もし本バイラスがCMVと別種のものであれば，同一植物にこれら両バイラスを重複接種した場合，この免疫現象がみられず両バイラスに感染して，それぞれの病徴を現わす筈である。そこでキュウリとカボチャを用いて次のような実験を行つた。

(a) キュウリを用いての実験 キュウリ（落合節成）に対し先ず CMV（ペチュニアから分離した ordinary strain）を汁液接種した。接種後8～10日頃から veinclearing, mosaic などの病徴が現われた。接種後16日目にこのキュウリに対し，カボチャ・モザイク・バイラスを汁液接種した。始めの CMV 接種後31日目，即ち第2回目の接種後15日目，キュウ

* 東京大学農学部

** 前報で自然でモザイクを呈している西洋カボチャの大部分から本カボチャ・モザイク・バイラスが分離されることを述べた。しかし昭和32年5月～6月にかけて東京東村山，田無一帯の芳香青皮栗カボチャ（通称，東京カボチャ）にモザイク株が多発したがこれらはいずれもキュウリ・モザイク・バイラスによるものであつた。

第1表　カボチャ・モザイク・バイラスの物理的性質に関する試験結果（各区とも接種数6で各欄中の数は発病数を示す）

a)　耐稀釈性

実験年度＼稀釈度	10倍	50倍	100倍	500倍	1,000倍	5,000倍	10,000倍
1951 年	5	—	3	—	0	—	0
52 年	2*	—	0	—	0	—	0*
53 年 a	2	4	1	1*	0	0	—
b	4	5	3	1	0	0*	—

b)　耐熱性

実験年度＼処理温度	40°C	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C	70°C
1951 年	2	—	0	—	0	—	0
52 年	2	2	1	0	0	—	—
53 年	3	2	2	0	0	0	—

c)　耐保存性

実験年度＼保存日数	1日	2日	3日	5日	7日	10日	15日
1951 年	5	3	3	1	0	0	—
52 年	5	—	3	2	1	0	0

注：* を附した区は接種数が5になつたものを示す。

リの病徴は依然 mosaic で特殊の病徴は認められなかつた。しかし，このキュウリの上葉の mosaic 葉を切りとつて，シロウリに対し汁液接種を行つた所，接種後3～4日でシロウリの接種葉には local lesion を生じ[13]，10日目頃よりはシロウリの上葉に mosaic の全身感染の症状がみられた。この結果からシロウリに対し接種を行つた接種源，即ちあらかじめCMV を接種し，後カボチャ・モザイク・バイラスを接種したキュウリ葉の中で CMVと共にカボチャ・モザイク・バイラスも増殖したことがわかつた。

(b) カボチャを用いての実験　日本カボチャ（白菊座）に対しまず本バイラスを汁液接種した。接種後 10 日目に既に mosaic の現われた上葉に再び CMV((a) と同じ strain) を汁液接種した。CMV 接種後3日目にその接種葉には local chlorotic spot が生じ，後次第にこれらは necrotic に変つていつた。（西洋，ペポカボチャに比べ日本カボチャにおける CMV による local lesion は鮮明なので[12]，本実験では日本カボチャを供試した）。この結果は本バイラスに侵されたカボチャがなお CMV に対して感受性を有することを示すものといえよう。これら両実験から本バイラスと CMV との間には交叉免疫作用はないものと考えられる。

C. 本バイラスの同定

本バイラスはその寄主範囲が主にウリ科植物に限られている点から CMV 或は Tobacco ring spot virus[19,20,24,25]とは別種のものであることはほぼ確実といえよう。念のためCMVとの間に行つた交叉免疫試験も CMV とは別種のものであることを示した。

今迄に報告されたウリ科植物を侵し，その寄主範囲の狭いバイラスの媒介昆虫，物理的性質，種子伝染の有無などについて一覧表をつくると第2表のようになる。この表を基にして比較してみることにする。

まず，媒介昆虫に関連して (1)，(2)，(3)，(4)，(6)はアブラムシ類によつて運ばれないこと，一部はハムシ類によつて運ばれる点で本バイラスとは別種のものといえよう。物理的性質の面からみると(1)，(2)，(7) は耐熱性が 70°C 以上，耐稀釈性，耐保存性も比較的安定で，本バイラスとは異ると認められる。また (11) はメロン上の病徴が本バイラスのそれと著しく異つている。(8) と (10) は未だ十分に調査されていないため，一応ここでは比較の対象から除くと残るのは (5)，(9)，(12) である。(5) はその媒介昆虫については調べられてないが，物理的性質などは Anderson[3] も既に指摘しているように (12) のそれに近く，本バイラスとも多くの点で似ている。(9)については Aycock[5] によつてスイカの接種葉に local lesion の形成が認められたが Lindberg[15]らの試験では全身感染しており，本バイラスの場合に近い。このように比較してくると若干の不明の点，差異のみられる点もあるが，本バイラスは (5)：インドで Vasudeva らによつて報告された Bottle gourd mosaic virus (Cucumis virus 3)，(9)：アメリカで Aycock の報じた Cantaloupe mosaic virus 及び (12)：Anderson の Watermelon mosaic virus (*Marmor citrulli*) のいずれにも近いと考えられる。

最近 Lindberg ら[15]は Wisconsin，California，Florida で分離したウリ科植物のみを侵す 13 のバイラスを媒介昆虫，物理的性質を基にして melon group と squash group に2大別している。melon group は melon mosaic virus と命名され，アブラムシ伝搬陽性であるが 60°Cの熱処理，28日の保存，5,000 倍

第2表 主としてウリ科植物に寄生性の限られた既知諸バイラスの媒介昆虫，物理的性質などの比較

バイラス (別名)	報告者(発表年次)	媒介昆虫		物理的性質		
		ハムシ類	アブラムシ類	耐熱性	耐稀釈性	耐保存性
(1) Cucurbit mosaic virus (English cucumber mosaic virus, *Marmor astrictum*)	Ainsworth (1935)[1] Vasudeva et al. (1949)[23]	−	−	80〜90°C 86〜88	100 億 1,000〜1万	1 年 90日
(2) Squash mosaic virus	Freitag (1941, 1956)[8,10]	+	−	75	100 万	42日
(3) Muskmelon mosaic virus (Cucurbit ring mosaic)	Freitag (1941)[8]	+	−	60 以上[15]	1 万以上[15]	28日以上[15]
(4) Wild cucumber mosaic virus	Freitag (1941)[8]	+	−	60 以上[15]	1 万以上[15]	28日以上[15]
(5) Bottle gourd mosaic virus (Cucumis virus 3)	Vasudeva et al. (1943)[22]			55〜60	500	4.5〜6時
(6) Muskmelon mosaic virus (New York muskmelon MV, *Marmor melonis*)	Rader et al. (1947)[21] Anderson (1954)[3]		−	60〜62 70	2,500〜3,000 1 万	3〜12日 14日
(7) Wild cucumber mosaic virus	Porter et al. (1951)[18]			75	100 万	180日 (−20°C)
(8) Southern squash mosaic virus	Anderson (1951)[2]					7 日〜14日
(9) Cantaloupe mosaic virus	Aycock (1951)[5] Freitag (1952)[9]	−	+	50〜60[15]	1,000〜5,000[15]	28日以上[15]
(10) Western watermelon MV	Freitag (1952)[9]		+			
(11) Muskmelon vein necrosis virus	Freitag (1952)[9]					
(12) Watermelon mosaic virus (*Marmor citrulli*)	Anderson (1954)[4]		+	60[4] 50〜60[15]	1 万[4] 1,000〜5,000[15]	10日[14] 28日[15]
供試カボチャ・モザイク・バイラス	著 者 (1957)	−	+	50〜55	500〜1,000	5〜10日

の稀釈によつて不活性化するもので第2表の(9),(10)その他が含まれ，squash group は squash mosaic virus と wild cucumber mosaic virus とから成り，アブラムシによつて伝搬されず，上記各処理によつて不活性化されないもので (2),(3),(4),(6) その他が含まれるという。これに従えば本バイラスは明らかに melon mosaic virus に該当する。

D. シロウリ，トウガ，スイカのモザイク株から分離されるバイラス

自然でシロウリ，トウガのモザイク株を屢々みかける。トウガではその生長点附近の葉に chlorotic spot を生じ，時にそれらが癒合し mosaic 症状を呈することもあるが奇形は生ずることなく，病徴は比較的軽微で，その発生もあまり多くはない。一方シロウリでは mosaic, veinbanding を呈するものから著しい奇形を示すもの迄各種の病徴がみられ一般に激しくその発生も多い(第1図)。

この病原バイラスは初めCMVと推定した。しかし，CMVをシロウリ，トウガ及びスイカに接種すると，いずれもその接種葉に local lesion を生ずるだけで全身感染することがない。またカボチャ・モザイク・バイラスの接種により生ずる病徴が自然発病のそれに

符合する所が多いのでシロウリ，トウガのモザイク・バイラスはカボチャ・モザイク・バイラスと同一或は近縁なバイラスではないかという疑を抱いた。そこで上記病徴を呈しているシロウリ，トウガと，スイカの veinbanding を呈している株（野外での発生は稀で今迄に東京都江戸川においてシロウリ畑に隣接するスイカ畑で1例観察しただけである）を採集し，これらを数種ウリ科植物と CMV判定用のササゲ（姫），ソラマメ（早生）及び *Nicotiana glutinosa* にそれぞれ汁液接種し寄生性の有無とその病徴を比較した。その結果を第3表に示す。なお比較のためカボチャ・モザイク・バイラスと CMV もこれら植物に接種した。



第1図　圃場でみられるシロウリ罹病葉の奇形とモザイク

第3表の結果から考察すると供試シロウリ，トウガ，スイカのモザイク・バイラスは寄生性の面からみるとCMVとは異なり本実験の範囲内ではカボチャ・モザイク・バイラスと一致しているようである。更にこれらをアカザを含むウリ科以外の植物に対して汁液接種した結果いずれもアカザには前報で述べたと同様の大型 local lesion を生じ，その他の植物には感染を認めなかつた。その蚜虫伝搬，物理的性質などについてはまだ調べてない。しかし第3表に示した数種植物に対する接種試験による寄生性の有無及びその病徴，更に寄主範囲が狭くアカザに local lesion を生ずることから推察すると，シロウリ，トウガ，スイカのモザイク・バイラスもほぼカボチャ・モザイク・バイラスと同一かまたは近縁なバイラスと考えられる。

4. 考　察

第3表　数種植物に対するカボチャ，シロウリ，トウガ，スイカ，キュウリなどのモザイク・バイラスの汁液接種試験結果

接種植物／バイラスの種類	セイヨウカボチャ	シロウリ	トウガ	スイカ	ササゲ（姫）	ソラマメ	グルチノザ
カボチャ・モザイク・バイラス	S	S	S	S	—	—	—
シロウリ・モザイク・バイラス(A)*	S	S	S	S	—	—	—
シロウリ・モザイク・バイラス(B)*	S	S	:	:	—	—	—
トウガ・モザイク・バイラス	S	S	S	:	—	—	—
スイカ・モザイク・バイラス	S	S	S	S	—	—	—
C M V**	L+S	L	L	L	L	L	S

注：(1) * (A) は江戸川で (B) は世田谷で採集した材料を示す。(2) ** キュウリから分離した ordinary strain である。(3)各欄でSは全身感染を，Lは local lesion，—は感染のみられなかつたことを，：は試験を欠くことを示す。

関東地方でカボチャに見出されるモザイク病株からしばしば分離されるバイラスを Lindberg らの Melon mosaic virus と同定した。Lindberg らによると，これにはいくつかの系統があり，アメリカの Cantaloupe mosaic virus (Freitag), Watermelon mosaic virus (Anderson), Yellow watermelon mosaic virus (Anderson) などはこれに含まれるという。本実験のカボチャ・モザイク・バイラスもこの1系統に入るものといえよう。以上比較したバイラスはいずれも自然で発病しているウリ類から分離されたものであるが，最近果樹類を侵しているバイラスの中，人工接種によりウリ科植物に寄生性を有するものも若干報告されている[6,7,11,17]。これらバイラスはその寄主範囲が狭いという点で第2表にあげたウリ類諸バイラスと類似した点をもつている。しかし本カボチャ・モザイク・バイラス及び第2表のバイラスはいずれも果樹類に対する接種試験を欠いているため，これらとの関係は現在論じ得る段階に来ていない。

次にシロウリ，トウガ，スイカのモザイク株からも寄生性の点から本バイラスと同一或は近縁のバイラスが分離された。これに関連して興味ある問題がでてく

る。即ちシロウリ，トウガなどでは自然で多く発生しているのに，実験的には汁液接種によつて容易に感染するキュウリ，メロン，スイカなどには本バイラスに罹つたものが全然或いは極めて稀にしか見出されないことである[14]。これについては更に発病状況，媒介昆虫の着生状況或いは圃場での植物の抵抗性など研究，調査が必要で，前報で述べた種子伝染を含むバイラスの越冬方法の確認などと共に今後の追及すべき問題点といえよう。

摘　　要

1) カボチャ・モザイク・バイラスの耐稀釈性は500～1,000 倍，耐熱性 50～55°C，耐保存性は 5～10 日であつた。

2) 本バイラスと CMV との間でキュウリ，カボチャを用いて行つた交叉免疫試験では両バイラス間に交叉免疫作用はみられなかつた。

3) 前報の結果とあわせ既知の諸バイラスの記載と比較した所，本バイラスは Lindberg ら (1956) の Melon mosaic virus の1系統と認められる。Vasudeva ら (1943) によつてインドで報告された Bottle gourd mosaic virus (Cucumis virus 3), アメリカで報ぜられた Aycock (1951)の Cantaloupe mosaic virus, Anderson (1954) の Watermelon mosaic virus(*Marmor citrulli*) は本バイラスと近縁な系統のようである。

4) シロウリ，トウガ，スイカのモザイク株から本バイラスとほぼ同一或は近縁と思われるバイラスを分離した。

(1957 年 7 月 11 日受理)

引　用　文　献

1) Ainsworth, G. C. : Ann. appl. Biol., 22: 55～67. (1935).
2) Anderson, C. W. : Plant Dis. Reptr., 35: 233～234. (1951).
3) ――――: Phytopath., 44: 198～202. (1954).
4) ――――: ibid., 44: 371～374. (1954).
5) Aycock, R. : ibid., 41: 2. (1951).
6) Boyle, J. S., Moore, J. D. & Keitt, G. W. : ibid., 39: 3. (1949).
7) ―――― • ―――― • ――――: ibid., 44: 303～312. (1954).
8) Freitag, J. H. : ibid., 31: 8. (1941).
9) ――――: ibid., 42: 8. (1952).
10) ――――: ibid., 46: 73～81. (1956).
11) Hobbs, G. A. : ibid., 41: 16～17. (1951).
12) 小室康雄: 日植病報, 21: 162～166. (1956)
13) ―――― • 明日山秀文: 日植病報, 19: 18～24. (1954).
14) ―――― • ――――: 同上. 20: 77～82. (1955).
15) Lindberg, G. D., Hall, D. H. & Walker, J. C. : Phytopath., 46: 489～495. (1956).
16) Middleton, J. T. : ibid., 34: 405～410. (1944).
17) Moore, J. D., Boyle, J. S. & Keitt, G. W. : Science, 108: 623～624. (1948).
18) Porter, C. A. & McWhorter, F. P. : Phytopath., 41: 942～943. (1951).
19) Pound, G. S. : J. Agric. Res., 78: 647～658. (1949).
20) Price, W. C. : Amer. J. Bot., 27: 530～541. (1940).
21) Rader, Wm. E., Fitzpatrick, H. E. & Hildebrand, E. M. : Phytopah., 37: 809～816. (1947).
22) Vasudeva, R. S. & Lal, T. B. : Indian J. agric. Sci., 13: 182～191. (1943). (R. A. M., 23: 125～126. 1944).
23) ―――― • Raychaudhuri, S. P. & Singh, J. : Indian Phytopath., 2: 180～185. (1949). (R. A. M., 30: 259～260. 1951).
24) Wilkinson, R. E. : Phytopath., 42: 23. (1952).
25) Wingard, S. A. : J. Agric. Res., 37: 127～153. (1928).

Summary

The virus isolated from mosaic plants of squash, the symptoms and host range of which were described in the previous paper, withstood 50°C for 10 min., 1/500 dilution and 5 days' aging in vitro. It was inactivated in extracted sap by 55° C for 10 min., by 1/500 to 1/1,000 dilutions or by 5 to 10 days' aging at room temperature. It failed to protect cucumber and squash plants from infection by cucumber mosaic virus, showing that the virus is not allied to the cucumber mosaic virus.

The virus was compared with the descriptions of those viruses that have been reported to be infective principally on cucurbits, and was identified to be a strain of the melon mosaic virus designated by Lindberg et al. in 1956. It may be closely related to the bottle gourd mosaic virus described by Vasudeva and Lal in India, or to the cantaloupe mosaic virus reported by Aycock, or to the watermelon mosaic virus described by Anderson in U. S. A.

From mosaic plants of white gourd, oriental pickling melon and watermelon, a virus was recovered, being very similar with the present virus in pathogenicity.

(Fac. Agr., Tokyo University)

殺菌剤による稲熱病菌々体磨砕液のTTC還元力の阻害

高 村 芳 三 郎*

Yoshisaburō TAKAMURA: Inhibition of TTC reduction of the mycelial homogenates of the rice-blast fungus by fungicides.

菌体のＳＨ酵素，その他の酵素系及呼吸等が薬剤によつて阻害されることはすでに多く報告されている。佐藤[9]は植物幼胚を用いてＴＴＣ還元に関与するのはコハク酸脱水素酵素とみなしてよいと述べている。また平山[2]は植物病原菌約 20 種のうち稲熱病菌を含む数種はコハク酸脱水素酵素の活性が極めて強いことを報告している。本報告は稲熱病菌々体磨砕液のＴＴＣ還元力によつて，コハク酸脱水素酵素系の存在を明らかにし，且つ各種薬剤のそれに対する阻害様式を観察した結果である。

起稿に当り御薫陶を賜わつた岐阜大学橋岡良夫教授，並に実験を御指導下さつた本学平井篤造教授，その他山口昭，今泉照男の諸氏に感謝の意を表する。

1. 材料及方法

京大植物病学研究室から分譲を受けた稲熱病菌(K_3)を馬鈴薯煎汁添加 柄内培養基に，27°C 72 時間振とう培養したもの（胞子形成前）を供試した。実験に当つては上述の培養菌体を充分洗滌し，菌体湿重あたり約 5 倍の燐酸緩衝液 (0.1 M, pH 6.8) で冷却しながら磨砕し，軽く遠沈 (2,000 rpm, 5 min.) して，その上澄部を供試液とした。使用した薬剤は第 6 表に示した 12 種類（水銀剤 6，銅剤 1，その他 5）である。各薬剤は蒸溜水またはアセトン等の溶媒で 10^{-3} Mに稀釈し，以下 10^{-8} M まで対数稀釈とした。実験方法は佐藤[10]に準じ，Thunberg 管中に第 1 表に示す各液を加え，排気後 28°C 恒温器中に保ち 10 分後に反応を開始した。各実験毎に薬液を加えないもの（無処理），薬液及び基質を加えないものを設け，それぞれ蒸溜水で全量を 5 ml とした。反応開始 2 時間後20% トリクロル酢酸で反応を停止，形成された triphenyl formazan (TPF) を酢酸エチルで抽出しAKA光電比色計 (Antimon, filter S 48) を用い蒸溜水を基準として定量した。結果は特別の場合を除いてすべて無処理に対する百分比で示した。

第 1 表 Thunberg 管中の試験液の組成
Table 1. Constituents of the test solution in Thunberg tube.

	Component	Final concentration	Volume(ml)
Main tube	Phosphate buffer (pH 6.8)	0.02 mol	1.5
	Mycelial homogenates (20 %)	6 %	1.5
Side arm	Sodium succinate	0.02 mol	0.5
	TTC solution	0.02 %	1.0
	Fungicide solution or dist. water		0.5
Total			5.0 ml

2. 実験結果

(1) 磨砕液に対する菌体濃度

磨砕液に対する菌体湿重の割合を25～1 %とし，ＴＴＣ還元力との関係を調べた（第 2 表）。磨砕液のＴＴＣ還元は基

第 2 表 異る濃度における菌体磨砕液のＴＴＣ還元力
Table 2. The TTC reduction of homogenates at different concentrations of wet mycelia (% in weight to homogenizing media).

Percentage of mycelial weight (w/v)		25	20	15	10	5	1
Rate of TTC reduction (%)	(+) Substrate	135	100	67	37	14	13
	(−) Substrate	80	70	43	24	8	6

* 名古屋大学農学部

質を加えなくとも認められたが，基質の添加でそれは増加を示した。第2表のように 20 %菌体添加磨砕液でかなりの還元力が認められたので，以下の実験ではすべてこれに基質を加えて行つた。またこの菌体磨砕液 1 ml の乾燥重量は約 30 mg であつた。

(2) 菌体磨砕液の遠心分割とTTC還元力

前述の菌体磨砕液を第1図のようにフラクショネイションし，各分割についてTTC還元力を比較した(第3表)。最初の分割上澄部 (S_1 fraction) に認められた活性は第2の分割によつて上澄部 (S_2 fraction) にみられ，残渣 (R_2 fraction) には活性はほとんど認められなかつた。

(3) 耐熱性

菌体磨砕液のTTC還元力の熱失活について検討した (第4表)。すなわち 50°C 10 分の処理で活性が完全に失われた。

(4) マロン酸の阻害作用

TTC還元に関与する酵素の性質を検討するためマロン酸の阻害について実験を行つた。反応液は第1表に示した組成で，基質として最終濃度 0.02M のコハク酸ソーダを加え，マロン酸は蒸溜水の代りに最終濃度0.001～0.1M になるように加えた。結果は第5表である。なお50%阻害におけるコハク酸：マロン酸の濃度比は 13：1 であつた。

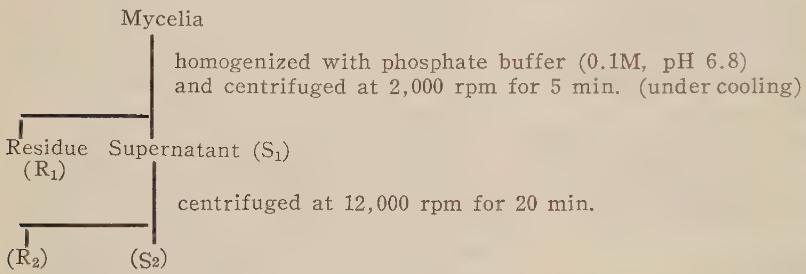
(5) 各種薬剤によるTTC還元の阻害

供試薬剤及び実験結果はそれぞれ第6表及び第2，3図に示した。

実験毎に測定値は一定しなかつたが，数回の反覆で比較的斉一な傾向が確められた。すなわち水銀剤は MEMC, EMP, MC, PMA, PMTS, EMTS の順で最も強い阻害を示し，銅剤 CS, 有機硫黄剤 TMTD, Zb がそれに次ぎ，その他の薬剤は阻害力が弱かつた。難水溶性の薬剤に用いる各種溶媒の影響が考えられたので aceton, polyethylene glycol (PEG)-300等について同様の方法で実験を行つた。その結果 10 %の濃度では何

第1図 菌体磨砕液のフラクショネイション

Figure 1. Fractionation of the mycelial homogenates.



第3表 第1図の各分割によるTTC還元力の比較

Table 3. Relative TTC reduction of each fraction shown in figure 1.

Fraction	S_1		R_1		S_2		R_2	
Substrate	+	−	+	−	+	−	+	−
Rate of TTC reduction (%)	100	72	9	8	64	45	4	4

第4表 TTC還元に対する菌体磨砕液の熱処理の影響

Table 4. Effect of heat on the TTC reduction of mycelial homogenates.

Temperature (°C)	—	40	40	45	45	50	55
Time of treatment (min)	—	10	20	10	20	10	10
Rate of TTC reduction (%)	100	26	15	9	6	0	0

第5表 菌体磨砕液のTTC還元力に対するマロン酸の阻害

Table 5. Effect of malonate on the TTC reduction of mycelial homogenates.

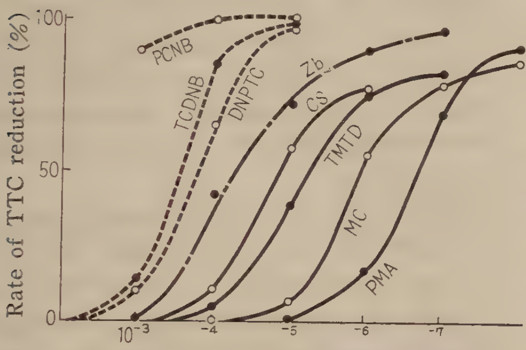
Malonate concentration (mol)	0		0.001		0.002		0.01		0.02	
Succinate (0.02 M)	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−
Rate of TTC reduction (%)	100	56	63	32	39	8	6	6	0	0

第６表 ＴＴＣ還元力の阻害実験に供試した殺菌性物質
Table 6. Fungicidal substances used.

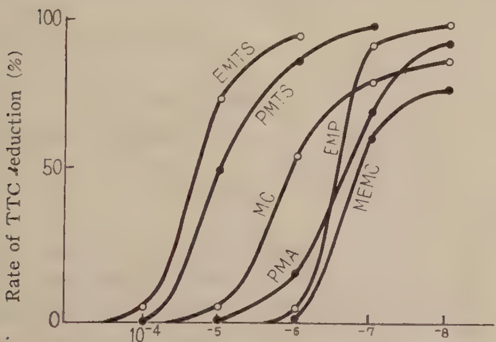
Fungicidal substances	Abbreviation	Remarks
Phenyl mercuric acetate	PMA	
Mercuric chloride	MC	* Supplied from Hokko Chemicals Co.
Ethyl mercuric phosphate *	EMP	
Methoxyl mercuric chloride *	MEMC	
Phenylmercuri-p-toluene sulfonanilide *	PMTS	
Ethylmercuri-p-toluene sulfonanilide *	EMTS	** Supplied from Nihon Noyaku Chemicals Co.
Copper sulfate	CS	
Tetramethyl thiuram disulphide **	TMTD	
Zinc ethylene bisdithiocarbamate **	Zb	*** Supplied from Yashima Chemicals Co.
Dinitro phenyl thiocyanate ***	DNPTC	
Pentachloro nitrobenzen ***	PCNB	
Trichloro dinitrobenzen ***	TCDNB	

Note ; These chemicals are raw ingredient of commercial fungicides, and have been purified by various solvents at the laboratories of the respective Chemicals Co., except for Zb, which is marketing goods, containing a carrier of 32.1 per cent.

第２図 異なる殺菌性物質によるＴＴＣ還元力の阻害比較
Figure 2. Comparison of the inhibitory action of the different fungicidal substances at different concentraions to TTC reduction.



第３図 有機水銀剤によるＴＴＣ還元力の阻害
Figure 3. Inhibitory action of the different organomercurials at different concentrations to TTC reduction.



れも顕著に阻害を示した。最終濃度アセトン１％以下，PEG-300 0.1 ％以下では影響がなかつたので，前述の各種殺菌性物質の溶解にはアセトン１％，PEG-300 0.1 ％を用いた。

（６） ＳＨ試薬の影響

ＳＨ基をもつ酵素系に対する阻害剤の作用が，ＳＨ試薬の添加で再賦活されることについては，すでに多くの報告がある。前述の菌体磨砕液に l- システイン塩酸塩を加えてこれを試験した。無添加区の活性 100 に対し， 10^{-4}, 10^{-3}, 10^{-2} M の各濃度のシステイン添加ではそれぞれ 121, 214, 240 と著しい TTC 還元の増加を示した。またシステインは TTC を無気的条件で自働的に還元することがある[10]ので，上述の反応液に菌体磨砕液を加えないで同様の処理を行つた。その結果 TPF の生成が認められたが菌体磨砕液を加えた対照 100 に対し，菌体磨砕液を加えないでシステインを 10^{-4}, 10^{-3}, 10^{-2} M 加えた区では，TTC 還元力はそれぞれ 0.2, 0.6, 1.7 の程度であつた。

次に水銀剤 PMA, MC, EMP 等についてシステインの影響を調べた。 10^{-4} M 以上の濃度のシステイン添加でこれらの薬剤による阻害の賦活が認められた。賦活の程度及びシステイン添加の方法などについては今後更に検討する予定である。

3. 論　議

中村ら[6]及田中ら[13]は合成培地を用いて稲熱病菌の呼吸代謝が培養開始後２週間目までは高いがその後急激に減少することを述べ，また平山[2]は稲熱病菌を馬鈴薯（または杏）煎汁で培養し，コハク酸脱水素酵素

の活性は培養10日目の材料で強いが，35日目の材料では認められないとしている。著者は本実験に先立ち，同じ菌株を用い馬鈴薯寒天培養基 10～15 日培養のものを材料とし，その菌そう（菌糸及び胞子を含む）を剝ぎとつて磨砕し，本報告と同様の方法で TTC 還元力を測定した[11]。その場合，反応に要する時間が非常に長い（15～18時間）ので，供試磨砕液の pH を 6.0 とした。さらに基質，磨砕液，TTC 等の濃度を高くしても反応時間は僅かしか早められなかつた。それ故馬鈴薯煎汁添加柄内液体培地を用いたが，これでは 4～7 日静置培養した材料(胞子形成前)で強い活性が認められ，さらに 72 時間振とう培養したものでは前述のように，反応開始後 2 時間で同様の強い活性が認められた。以上のように稲熱病菌々体磨砕液の TTC 還元力は培養日数によつて異なり，菌令の若い 4～7 日の材料（生育初期の菌糸）で極めて強いことが確められた。しかし菌糸と胞子の活性を比較するには更に綿密な実験を要する。

菌体磨砕液の遠心分劃と活性の関係では，松代ら[3]が *Bacillus cereus* で発育の段階を経るにつれて上澄の酵素活性が低下し，逆にそれが沈渣で増大することを報告している。稲熱病菌の生育初期の菌糸では 12,000 rpm 遠沈上澄に強い活性が認められた。TTC 還元力の熱失活については，佐藤[9]が植物幼胚で 50°C 30 分，山口ら[14]が緑葉で 50～60°C 10 分と報告しているが，著者の結果も 50°C 10 分を示しよく一致した。マロン酸による阻害は前述のように特異的で Quastel [8]の示した阻害指数*(10：1) に比較的一致し，また基質として加えたコハク酸ソーダによつて活性の高められたこと，等の結果から本実験の TTC 還元に関与するものは，稲熱病菌由来のコハク酸脱水素酵素系と考えてよいようである。

コハク酸脱水素酵素の殺菌剤による阻害については，Byrde [1]が *Sclerotinia laxa* について，lime sulpher, o-phenyl phenol が阻害を示し，captan, $CuSO_4$ が影響ないことを報告し，三浦ら[4]は 4 種の細菌について chlortetracycline, streptomycin がそれぞれ阻害を示すことを報告している。本実験で銅剤(CS)の影響が少ないことは Byrde の結果と類似したが，更に水銀剤の阻害が最も強く，dinitro 化合物が弱いことが確められた。水銀剤の阻害では MEMC, EMP が最も強く，次いで PMA, MC であり，PMTS, EMTS はやや阻害力が劣つていた。これは水沢[5]，田村[12]等が稲熱病菌及び稲胡麻葉枯病菌について行つた，有機水銀化合物の蒸気殺菌作用及び胞子発芽試験の順位とよく一致した。この結果，上記の試験における薬剤の作用点として，コハク酸脱水素酵素系が阻害されているものと考えることができる。また Owens[7] は PMA, MC について，pancreatic amylase に対して MC は 10^{-5}～10^{-6} M の間でシグモイド型阻害，PMC はその間に二つの阻害の山があることを報告しているが，本実験の succinodehydrogenase system ではそのような作用の特異性はなく，何れの薬剤も 10^{-4}～10^{-7} M の間でシグモイド型阻害を示した。最後に，システインを添加すると薬剤による阻害が再賦活されるので薬剤の作用がコハク酸脱水素酵素の S H 基との結合によることが考えられた。

* 50%阻害の時のコハク酸に対するマロン酸のモル比。

4. 摘 要

各種殺菌剤が稲熱病菌々体磨砕液の TTC 還元に及ぼす作用について検討した。菌体は馬鈴薯煎汁添加柄内培養基に 27°C 72 時間振とう培養したものを主として用いた。反応は 28°C 2 時間。耐熱性 50°C10分。コハク酸ソーダの添加で活性は高められた。またマロン酸は基質として同時に与えたコハク酸と等濃度またはそれ以上の濃度で強く阻害した。以上の結果から本実験の TTC 還元に関与するのはコハク酸脱水素酵素系と考えられる。

各種殺菌剤による阻害は水銀剤 MEMC, EMP が 10^{-6}～10^{-7}M で最も強く，次いで PMA, MC が 10^{-4}～10^{-6}M, PMTS, EMTS が 10^{-4}～10^{-6}M の順を示し，銅剤 CS, 有機硫黄剤 TMTD, Zb は 10^{-3}～10^{-5} M, dinitro 化合物 DNPTC, TCDNB は 10^{-3}～10^{-4}M でそれぞれ阻害した。PCNB は影響がなかつた。アセトン，PEG-300 等の溶媒も最終濃度 1 %以上では阻害がみられた。10^{-4}M 以上のシステイン添加で薬剤の阻害が再賦活された。

(1957 年 10 月 3 日受理)

引 用 文 献

1) Byrde, R. J. W. et al. : Nature, 178 (4534) : 638～639. (1956).
2) 平山重勝：帝国学士院紀事，9 (10) : 639～641. (1933).
3) 松代愛三，他：生物科学，8 (特) : 7～10. (1956).
4) 三浦義彰，他：科学，26 (7) : 362～363. (1956).
5) 水沢芳名：農技研病理中報，9 : 97～100. (1956).
6) 中村幸彦，他：北大農邦紀，2 (1) : 30～34. (19

55).
7) Owens, R. G. : Contribs. Boyce Thompson Inst., 17(3) : 221～242. (1953).
8) Quastel, J. H. et al. : Biochem. J., 21 : 1224～1251. (1927).
9) 佐藤七郎：植雑，69(816)：273～280. (1956).
10) 佐藤　了：標準生化学実験. (1953) p. 304.
11) 高村芳三郎：日植病報，22(1)：33. (1957).
12) 田村浩国：日植病報，22(1)：28. (1957).
13) 田中正三，他：日化，74(1)：35. (1952).
14) 山口　昭，他：ウイルス，6(1)：1～8. (1956).

Summary

A study has been made on the TTC reduction of the mycelial homogenate of rice-blast fungus, *Piricularia oryzae* Cav., particularly on its inhibition by several fungicides. The mycelia grown on Tochinai's synthetic media containing potato decoction at 27°C for 72 hours in shaken culture, were homogenized and fractionated according to the scheme shown in fig. 1, and the supernatant obtained was poured into Thunberg tube for test. After 2 hours of incubation at 28°C, the produced TPF (triphenyl formazan) was measured by an electrophotometer (filter S 48). As a relatively marked TTC reduction of the homogenates was noted at a rate of 20 g mycelia per 100ml homogenate, this concentration was used throughout the experiments.

A considerable portion of the activity of TTC reduction was retained in the supernatant fraction after the centrifugation of mycelial homogenates (Table 3). TTC reductivity of the homogenate was lost by heat treatment at 50°C for 10 minutes, and by addition of malonate at a concentration of 0.02 M, while reduction was accelerated by adding 0.02 M succinate (Tables 4 and 5). Therfore it seems to be reasonable to assume that the TTC reduction above mentioned is probably attributable to succinodehydrogenase system of the present fungus. As shown in the figures 2 and 3, TTC reduction was retarded by various fungicides, especially by those belonging to mercuric group, among which MEMC and EMP exhibited a strong inhibition at concentrations of $10^{-5} \sim 10^{-7}$ M. The grade of inhibition decreased in the following order; PMA, MC $10^{-4} \sim 10^{-6}$ M; PMTS, EMTS $10^{-4} \sim 10^{-5}$ M; copper sulfate, thiram and zineb $10^{-3} \sim 10^{-5}$ M; DNPTC, TCDNB $10^{-3} \sim 10^{-4}$ M; PCNB did not inhibit at all. These results are consistent with those obtained in the author's another experiment on the vapor action of fungicides and the direct fungitoxicity to spore germination. Cysteine at concentrations of $10^{-2} \sim 10^{-4}$ M increased the rate of TTC reduction, and reversed the inhibition by the mercuric compounds such as PMA, MC and EMP. (Faculty of Agriculture, Nagoya University)

雑　録

キューバのイネの Hoja blanca 病

Raya blanca 時に Cinta blanca とも呼ばれる。Venezvela, Panama 及び北米 Florida にも発生が知られている。病徴はシマハガレ病に似ているが，葉の斑紋はもつと鮮かで，又新葉が展開しないで早く枯れる事はないようである。昨年私達が現地で調査して実験計画を立てて置いて来たが，最近 Habana の試験場の J. Acuña Galé 博士から vector が1つみつかつたという来信があつた。これは *Sogata oryzicola* Muir（セジロウンカに類似）で，野外からとつた虫の８％の個体が媒介可能で，ウイルスの虫体内潜伏期間８―９日，植物体内での病徴潜伏期間 17―19 日となつている。この虫は同国至るところの水田及び水田以外にも甚だ多い。又米国 Louisiana の J. G. Atkins 博士からの来信によると，米国農務省で行つた現地試験の結果，日本及び附近産のイネの品種の中に耐病性と考えられる品種が多数みつかつたとの事である。

（向秀夫・飯田俊武）

オオムギ白渋病菌の侵入菌糸及び吸器と寄主細胞との関係に就いての観察

第 3 報 (1) 副細胞感染 (2) Ca 塩類による罹病性増大

平田幸治・富樫邦彦*

Koji HIRATA & Kunihiko TOGASHI: Some Observations on the Relation between the Penetration Hypha and Haustorium of the Barley Mildew and the Host Cell (III). (1) Initial Infection of Auxiliary Cell, (2) Increment of Susceptibility by Calcium Salts.

緒　　言

オオムギの幼苗の第一葉を切取り，白渋病菌の分生胞子を接種して，ペトリ皿内の水に葉片の基部を挿しておくと，その品種の鉢植えのままの幼苗の白渋病罹病性の程度に大体応じた数，大いさの菌叢を生ずる。従つてこの方法によつて，幼苗の白渋病罹病性を品種間等について比較することができる。こうして接種した葉片を接種後 2～3 日目に，前報 (1956) で述べたように，ホルマリン，アルコール，氷醋酸の混合液で固定し，酸性フクシンで染色して，葉片ぐるみ鏡検する間に，罹病性または抵抗性のどの程度の品種においても，胞子が発芽して最初に形成する吸器(第一吸器)が副細胞では比較的に発育し易く，普通の表皮細胞では発育が妨げられることが多いのに気付いた。このことは第一吸器形成に対して，普通の表皮細胞は副細胞よりも抵抗性であることを示すもので，前報で簡単に触れておいた。

副細胞に第一吸器が形成されること（以下これを副細胞感染と略記する）の条件を知ろうとして，接種の時刻をかえたり，葉片を暗所においたり，水洗したり，また種々の化合物の溶液を吸わせる目的で，接種した葉片を溶液に挿すことを試みる間に，Ca の塩類が罹病性を著しく高めることを知つた。

副細胞感染が多い理由，Ca 塩類が罹病性を高める理由はまだ明らかにし得ないが，これらの現象が著しいので，今まで観察したところを一先ず報告して，読者の批判教示を得て実験を進めたいと思う。

本文中の表の感染数というのは，葉片の下面の約 3 cm の長さの範囲に接種して生じた菌叢の数で，各々の試験，品種毎に4—5葉片について調べたものの平均値である。副細胞感染率というのは感染数に対する副細胞感染数の割合(%)である。感染数は大きくても菌糸の発育の悪いことがあるので，品種間の罹病性，抵抗性の程度を比較するには，感染数と菌糸の発育程度を併せ調べねばならない。

本文に入るに先だつて，平田が東京大学農学部明日山秀文教授の下に内地留学中，この仕事の緒を与えられ御指導を賜わつた同教授に深謝の意を表する。尚その後仕事を進める上に文部省科学研究費の援助によつたところが多い。

(1) 副細胞感染

第 1 表は同時に播種し，生育条件，生育程度が大体同様と思われる 12 品種の幼苗の第 1 葉片に同時に接種した結果である。どの品種においても，副細胞感染率がかなり高く，全葉面積に対して副細胞が占める大体の面積割合 3 % を遙かに越えている。接種の際に副細胞の近辺に胞子が特に多く撒付けられるというこ

第 1 表　諸品種の感染数，副細胞感染率比較

品　種	H_2O			$CaCl_2$		
	感染数	副細胞感染数	副細胞感染率	感染数	副細胞感染数	副細胞感染率
五畝四石	132	116	88%	428	152	36%
槙　　綱	51	30	59	473	155	33
コビンカタギ	123	85	69	441	221	50
畿内交野	180	124	69	390	154	39
紅梅埼 1 号	194	128	66	351	191	54
大　阪　奴	119	111	93	187	100	53
細稈 2 号	109	60	55	363	21	6
早　生　稞	73	60	82	140	105	75
御　島　稞	54	40	74	70	34	49
会津 4 号	53	25	47	147	12	8
岩手メンシュアーリー	20	12	60	284	46	16
ゴールデンメロン	15	14	93	98	21	21
平　均	94	67	71	281	101	36

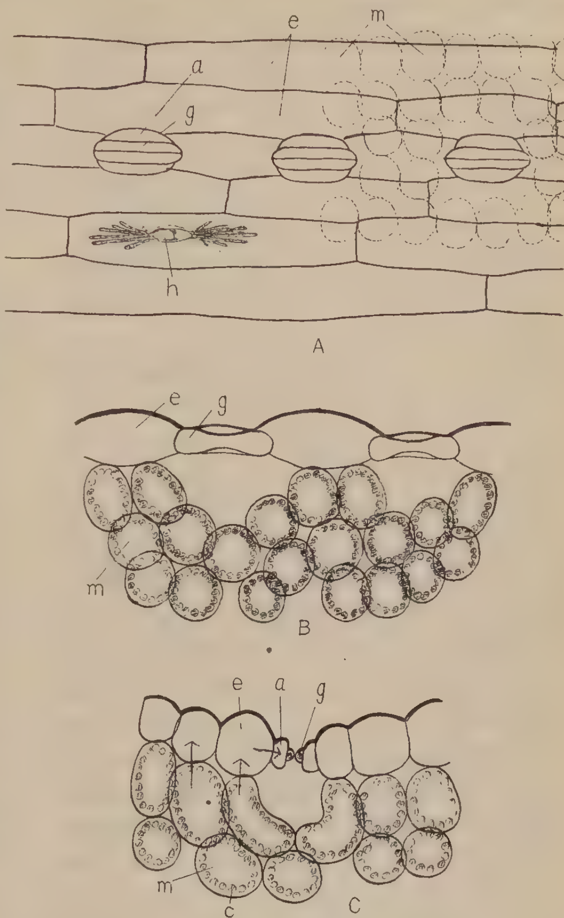
* 新潟大学農学部

とはなく，発芽管が副細胞の方に特に向うということもなく，また侵入菌糸は普通の表皮細胞にもよく形成されるのであるから，副細胞感染率が3%以上になるというのは，副細胞では普通の表皮細胞でよりも第一吸器が発育し易いことを示す。第1表の接種試験では副細胞感染率が全般に高く出たが，何時の接種でもこんなに高くなるとは限らない。併し例えば五畝四石について，色々の時期に行つた接種試験における副細胞感染率をみると，時によりかなり変動してはいるが，どの場合でも3%をかなり上廻つている（第2表）。

第2表　3品種の副細胞感染率比較

五畝四石	会津4号	ゴールデンメロン
77%	2%	
89	2	
88	47	
64	8	
89	15	
95	13	40%
36	8	21
88	47	93
10	3	8
89	8	5
	32	25
33		17
29		32
25		28
40		33
49		61

副細胞感染率がこのように高いのは，気孔の開閉と深い関係があるためかと始め想像したのであるが，1日の中の時刻をかえて接種しても，副細胞感染率に特に開きを生じない。後で述べるように，葉片を無機塩類の溶液に挿すことによつて，感染数，副細胞感染率が大きく動くことからみて，副細胞の膜の厚さとか，副細胞が葉面から落ちこんでいることも，副細胞感染率と特に深い関係があるとは思えない。顕微鏡的にみて副細胞が普通の表皮細胞と異ると思われる点として，気孔の開閉に伴つて運動すること，葉面より落ちこんでいることの外に，特別に小さいことと，葉肉細胞に接着しないことがあげられる（第1図）。副細胞に吸器が形成されているのを葉面から鏡検すると，副細胞の内部全体が，指状の突起を真直ぐに伸ばし得ないで窮屈そうにしている吸器によつて占居されている。副細胞に吸器が形成され菌糸が発育するにつれて，隣接する細胞から副細胞に向つて養水分が補給されねばならないが，隣接する細胞といえば開閉細胞と普通の表皮細胞である。その中開閉細胞は副細胞より更に小さいし，



第1図　オオムギの葉の表面と断面

A は表面図，B.C は断面図　e 表皮細胞，g 開閉細胞，a 副細胞，m 葉肉細胞，c 葉緑体，h 吸器
吸器と副細胞との大いさの割合，開閉細胞，副細胞が葉肉細胞に接着しないことを示す。c の矢は養水分の移動の方向を示す。

葉肉細胞に接着しないので，副細胞に養水分を補給することは殆ど考えられず（伸びた菌糸の容量は開閉細胞の容量より遙かに大きい），副細胞が受ける養水分の大部分は隣接する表皮細胞からのものである。その表皮細胞も養水分をその下の葉肉細胞に仰ぐのであるから，副細胞の吸器も普通の表皮細胞内の吸器も，葉肉細胞から補給される養水分を吸収するのであるが，副細胞の吸器は，普通の表皮細胞を一旦通過したものを吸収する訳である（第1図 c）。

副細胞感染の場合の菌糸の発育状況をみると，普通の表皮細胞に第一吸器が形成された場合に比べて劣ることが多い。副細胞では第一吸器は形成され易いが，

養水分吸収はむしろ困難であるということができよう。抵抗性品種の場合に副細胞感染による菌糸が僅か伸びただけで死んでいることが多いが，こんな場合から考えると，副細胞に向つて隣接の表皮細胞から養水分が供給されるにつれて，吸器の養水分吸収ができなくなるものと思われる。このような事情は，吸器の副細胞に対する害作用によるものか，隣接表皮細胞から副細胞に補給される養水分が不充分であるためか，又は有害であるためか，またはその他の理由によるものか明らかにすることができない。

第1表にあるように，品種によつて副細胞感染率がかなり異なる。同一品種でも時によつてかなり変動するのであつて，第1表は，いうまでもなく，それぞれの品種の何時でもの数値を示すものではない。しかし品種間で副細胞感染率にある程度の差があることは認め得るようで，第2表に示すように会津4号は五畝四石よりも，何時の接種試験においても低い副細胞感染率である。この表以外の接種試験でも会津4号は低い副細胞感染率を示すことが目立つ。副細胞感染率が高いのは，葉面の大部分を占める普通表皮細胞に第一吸器が発育し難いためであるから，抵抗性が高い品種では副細胞感染率が高いように想像される。しかし第1,2 表に見るように，品種の罹病性，抵抗性の程度と副細胞感染率との間には平行的な関係を認め難い。第2表の3品種の中で五畝四石は罹病性高く，会津4号はかなり高い抵抗性，ゴールデンメロンは更に強い抵抗性の品種であるが，会津4号の副細胞感染率が最も低く，五畝四石とゴールデンメロンとの間では差が明らかでない。細稈2号は罹病性中位の品種であるが，副細胞感染率が低いことが多い。

次の項で述べるように，Ca の塩類の溶液に葉片を挿すと，罹病性が著しく高くなる。第1表の $CaCl_2$ 区では水の場合に比べて，大方の品種において感染数が2 -3 倍，岩手メンシュアーリーでは 14 倍，ゴールデンメロンでは6倍以上にもなつている。$CaCl_2$ によつて副細胞感染も増す傾向が見られるが，普通の表皮細胞の感染数の増加が著しく，どの品種でも例外なく副細胞感染率がかなり低くなつている。$CaCl_2$ のために罹病性に傾く程度が，副細胞よりも普通表皮細胞で一層大きいということができる。Ca 塩類の濃度を変えてみると，0.01 モルよりも 0.04，0.07，0.1 モルと濃度が高いほど副細胞感染率が低く

第3表　Ca 塩類の濃度と感染数，副細胞感染率との関係

$Ca(NO_3)_2$	細稈2号		岩手メンシュアーリー		ゴールデンメロン	
	感染数	副細胞感染率	感染数	副細胞感染率	感染数	副細胞感染率
0(モル)	4	51%	4	0%	1	100%
0.01	13	36	12	79	9	19
0.04	12	33	52	41	6	44
0.07	28	7	91	27	107	4
$Ca(H_2PO_4)_2$	五畝四石		岩手メンシュアーリー		会津4号	
0(モル)	39	99%	21	80%	4	71%
0.005	41	91	11	79	57	46
0.01	65	83	67	67	62	48
0.04	72	76	48	32	109	24
0.07	36	65	18	51	34	28

なる傾向がかなり強い（第3表）。

葉片を暗所においたり，水洗して，葉片がやや黄化した場合にも，感染数が著しく多くなり副細胞感染率が小さくなる（第4表）。

NH_4，Li の塩類の溶液に葉片を挿すと，反対に罹病性が低くなり，感染数が小さくなるが，副細胞感染率は高くなる傾きがある。即ち普通表皮細胞の罹病性が特に低下することが認められる。前述の Ca 塩類，水洗，暗黒処理の影響を思い合わせると，普通表皮細胞の罹病性，抵抗性は，副細胞のそれよりも，これらの処理によつて変動を受け易いということができよう。

第4表　水洗又は暗所におく場合の感染数と副細胞感染率

A

塩類	水洗11日				水洗なし			
	五畝四石		ゴールデンメロン		五畝四石		ゴールデンメロン	
	感染数	副細胞感染率	感染数	副細胞感染率	感染数	副細胞感染率	感染数	副細胞感染率
H_2O	73	10%	86	8%	10	89%	19	5%
$Ca(NO_3)_2$	98	12	165	6	118	9	149	2

B　水洗 21 日

塩類	五畝四石		会津4号		ゴールデンメロン	
	感染数	副細胞感染率	感染数	副細胞感染率	感染数	副細胞感染率
H_2O	74	2%	119	5%	45	6%
$CaCl_2$	119	9	333	2	438	4
$(NH_4)_2SO_4$	171	8	128	2	155	3

接種試験は真夏の期間を除いて，殆んど年中繰返し行つたのであるが，6 月下旬から7月上旬にかけて副

C 暗所 7 日

塩類	横綱		細稈 2 号	
	感染数	副細胞感染率	感染数	副細胞感染率
H_2O	91	12%	81	4%
$CaCl_2$	70	16	143	3
$(NH_4)_2SO_4$	67	12	20	7

D 暗所 8 日

塩類	五畝四石		会津 4 号	
	感染数	副細胞感染率	感染数	副細胞感染率
H_2O	43	2%	138	4%
$CaCl_2$	45	0	78	8
$(NH_4)_2SO_4$	41	5	209	5

細胞感染率が高くなるのを認めた。その頃の気温はオオムギの生育にも不都合であるし，白渋病菌の生育適温とされるものよりもかなり高い。前に述べたようにオオムギの葉片を暗所においたり，水洗すると感染数が多くなり，副細胞感染率が低くなる。暗所においたり水洗した場合と，高温による場合とで，葉の弱り方，葉の生理状態は同様でないかも知れないが，夏にかけて副細胞感染率が上つたのは，葉片の側よりも，むしろ胞子が弱つていることに大きい原因があるように思われる。胞子を人為的に弱らせた場合の感染状況については別に試験を進めている。

なお，第二以後の吸器の形成については，第一吸器に見られるような副細胞との深い関係はないようである。抵抗性品種において，第一吸器が形成された後菌糸が僅かに発育しただけで，第二吸器の形成を見ずに死ぬような場合は別として，副細胞感染率が極めて高い場合でも，第二以後の吸器は普通の表皮細胞によく形成される。

（2） Ca 塩類による罹病性の増加

副細胞感染を支配する条件が分らないかと思つて，葉片に吸収させる目的から，接種後葉片を種々の化合物の溶液に挿すことを試みる間に，Ca の塩類が葉片の罹病性を著しく高めることを知つた。それらの試験の結果の一部が第 6 表で，表の中の塩類溶液の濃度は 0.01 又は 0.015 モルである。

Ca の塩類の中で，$Ca(NO_3)_2$, $CaCl_2$, $Ca(H_2PO_4)_2$, の何れによつても，水の場合に比べて感染数が著しく大きくなるばかりでなく，菌糸の発育も優る。第 4 表に示すように，0.04，0.07 モルでは更に罹病性が高まるようで，0.1 モルでも感染数はかなり大きい。

Ca 塩類によつて罹病性が高まるのは，罹病性，抵抗性のどの程度の品種にも見られることで，罹病性が最も高い品種（五畝四石，コビンカタギ，横綱等）においても，水に挿した葉片，表にはないが鉢植のままの第一葉は，Ca 塩類によつて破られる抵抗性を具えているということができる。ゴールデンメロンのような抵抗性が高い品種でも，Ca 塩類によつて感染数が著しく多くなる。菌糸の発育程度を問題にしないで，感染数だけについていうと，Ca 塩類の効果は罹病性品種においてよりも，抵抗性品種の方で一層明瞭に現われるのが普通である。即ちゴールデンメロンを水に挿したのでは感染が殆んど，又は全然おこらないのに，Ca 塩類では数十もの感染を見ることが多い。しかし菌糸の発育は極めて悪いことが多く，罹病性品種を水または Ca 塩類で処理したものに遙かに劣る。従つてゴールデンメロン等の抵抗性品種では，Ca 塩類によつて抵抗性が破られるけれども，Ca 塩類によつて破られない抵抗性がなお残つていることが明らかである。

Ca 塩類による罹病性の増加或いは抵抗性の低下は，オオムギ白渋病菌の生態型をかえても，また異なる生態種に対しても認められる。本報告で接種に用いているのは，ここで述べる以外は専ら日浦(1954)による生態型 I であるが，生態型IX（日浦氏より分譲されたもの）に対して，ゴールデンメロンが $CaCl_2$ により罹病性が高まるのを認めた。またカモジグサの白渋病菌に対して，五畝四石がやはり $CaCl_2$ によつて罹病性に傾くことを確めた（第 5 表）。

第 5 表 異る生態種生態型と Ca 塩類との関係

塩類 ＼ 品種 ＼ 生態型	生態型 I	生態型IX	カモジグサ菌
	ゴールデンメロン	ゴールデンメロン	五畝四石
H_2O	1	0	21
$CaCl_2$	93	11	25
$Ca(H_2PO_4)_2$			52

以上のべたように Ca 塩類はオオムギの白渋病罹病性を著しく高める。Ca と白渋病罹病性とに関係した文献を探がし求めたところ，コムギ（河合 1955），ナタネ（Lind, Rostrup & Kölpin Ravn 1915），バラ，スグリ（Stutzer 1917, 1918），ササゲ（Brown 1930）について，土に石灰が多い時，或いは土がアルカリ性の時に白渋病の発生が多いことをのべたものがあるが，その理由について立入つた文献を見ない。Trelease

& Trelease (1928) は $Ca(NO_3)_2$, $MgSO_4$, KH_2PO_4 の 3 つの塩類の量の相互の比率を色々に組合わせてコムギを水耕し, $Ca(NO_3)_2$ の量が多い場合に白渋病罹病性が高まることを報告しているが, Ca の影響についてはこ特にのべていない。

葉片を 0.01 モルの Ca 塩類の溶液に 1 昼夜挿してから, 表皮を剝ぎとつて蓚酸の 0.1 モル溶液に浸すと, 表皮細胞内に蓚酸 Ca の結晶が, 水に挿した葉片の場合よりも多く現われる。このことは Ca が葉片の表皮細胞にまで吸収されること, Ca が表皮細胞内で遊離の状態または遊離し易い状態で含まれることを示すものと思う。接種した葉片を蓚酸 Na の 0.01 モル溶液に挿した場合に罹病性が低いことも, 葉細胞内の Ca が蓚酸と結合して結晶化することに関係があるようである。また葉片を数日間暗所においたり, 水洗すると, 罹病性が高くなるのであるが, このような処理をした葉片の表皮細胞内には蓚酸によつて蓚酸 Ca の結晶が多く形成される。こんな簡単な観察から推測を試みるのは危険であるが, 表皮細胞内に遊離状態または遊離し易い Ca が多く含まれることが, 罹病性を高めるのではなかろうか。しかし Ca がどうして罹病性を高めるかについては見当もつけることができない。

Ca の作用に関連して, 筆者が前に白渋病菌の人工培養を試みた時に気付いたことを一言のべたい。白渋病菌の人工培養には吸器を形成させることが第一要件であると考えて, アルコールで固定し, その後水洗したタマネギ鱗茎の表皮片を発芽床として, 無機塩類, 炭水化合物, アミノ酸等を色々に組合わせた液に浮かせて胞子を接種した。その時に Ca 塩類を含む溶液の場合には, 侵入菌糸がタマネギの表皮細胞内で僅かに膨らみ, 発育初期の吸器様のものを生じた。このことから Ca は吸器の発育に特別に深い関係があるように思つている。

この項の最後に Ca 塩類以外の数種の塩類について行つた接種試験の結果の一部を附加える (第 6 表)。

第 6 表 塩類と感染数

番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
品種 / 塩類	五畝四石	五畝四石	岩手大麦一号	会津四号	ゴールデンメロン	ゴールデンメロン	五畝四石	会津四号	岩手メンシュアーリー	五畝四石	紅梅埼一号	五畝四石	会津四号	五畝四石	紅梅埼一号	鴻巣三〇号	会津四号	岩手大麦一号	岩手大麦三号	岩手メンシュアーリー
H_2O	15	8	72	16	1	0	39	5	21	2	1	26	154	13	10	19	47	9	13	1
$Ca(NO_3)_2$	48	97	137		110	48						171	179	57		192	115			
$CaCl_2$	82	54		64						222	72			55	30	206	101	124	128	34
$Ca(H_2PO_4)_2$							65	62	67			196	294							
$MgCl_2$										69	45			34						
$BaCl_2$												21	33							
$(NH_4)_2SO_4$	17	3	28	12										0	3				6	4
NH_4NO_3	16	8																		
NH_4Cl	11	10		28																
KNO_3														10						
KCl														11	19					
$NaNO_3$																11	33			
$NaCl$																14	26			
$LiCl$																		2	6	34

Ca と同じくアルカリ土金属である Mg の塩化物は, Ca 塩類程ではないが, 罹病性をかなり高めるようであり, Ba の塩化物は罹病性を低くする (第 6 表 10—13)。NH_4 の塩類については接種試験をかなり数多く行つたのであるが, なお不審を残している (第 6 表 1—4, 14, 15, 19, 20)。罹病性をかなり低くする場合があるようである。K, Na の塩類 (塩化物, 硝酸塩, 燐酸塩) は罹病性に大して影響を持たないようで, Na 塩類の方が K 塩類よりもいくらか罹病性を高める

のが認められる（第6表14—17)。LiCl は罹病性を著しく低くする（第6表 18—20)。Li の塩類が白渋病に対する抵抗性を高めることについては，かなり古くから報告が出ている (Kent 1941, Reed 1915, Smith & Blair 1950, Vidali & Ciferri 1951 等)。第6表の実験 20 番に於て LiCl の溶液で感染数がかなり大きいのであるが，菌糸の発育が極めて悪く，その菌糸が異様に膨れているのが目立つた。

これらの塩類の中で K, Na の塩類と Ca 塩類の溶液とを同量宛混合した場合には，Ca 塩類単独の場合の感染数にかなり接近するが，Li 塩類と Ca 塩類との混合溶液では容易に罹病性に傾かない。

摘　要

1. 本報告はオオムギの諸品種の幼苗の第一葉を切取り，白渋病菌(日浦の生態型Ｉ)の分生胞子を接種してから，水または Ca 塩類等の溶液 (0.01 又は 0.015 モル）に挿して，接種後 2—3 日目の感染状況を比較調査した結果である。

2. 水に挿した場合に，罹病性，抵抗性のどの程度の品種においても，第一吸器（胞子が発芽してから最初に形成される吸器）が副細胞に形成されること（副細胞感染）が比較的に多く，感染数の 90％以上を占めることもある。

3. 副細胞感染は気孔の開閉運動との間に特に深い関係を認められず，副細胞の膜の厚さ，副細胞が開閉細胞と共に葉面から落ちこんでいることとも特別に関係はないようである。

4. Ca 塩類は罹病性，抵抗性のどの程度の品種に対しても罹病性を著しく高め，副細胞感染率を低くする。0.04 又は 0.07 モル溶液は更に大きい効果を持つている。Ca 塩類の作用はオオムギ白渋病菌の別の生態型（日浦氏の IX）に対しても，カモジグサの白渋病菌に対しても同様の傾向を示す。

5. $MgCl_2$ は罹病性を高めるが Ca 塩類ほどではなく，$BaCl_2$ は罹病性を低くする。NH_4 塩類は罹病性を低くする場合があり，K, Na の塩類は罹病性に大して影響しない。LiCl は罹病性を著しく低くする。

6. Ca 塩類と K, Na 塩類との等量混合液では，Ca 塩類単独の場合の罹病性程度にかなり近ずくが，LiCl の溶液と混合した場合には罹病性に傾き難い。

7. 葉片を暗所においたり，水洗してやや黄化したものでは感染数が多くなり，副細胞感染率が低くなつて，Ca 塩類で処理した場合に似る。

(1956 年 9 月 10 日受理)

文　献

1) Brown, R. E.: Phytopath., 20: 683〜685. (1930).
2) 平田幸治：日植病報，21: 23〜29. (1956).
3) 日浦運治•部田英雄：農学研究，41: 145〜156. (1954).
4) 河合一郎：農薬 2 (2): 17〜19 (1955).
5) Kent, N. L.: Ann. Appl. Biol., 28: 189〜209. (1941).
6) Lind, J., R. Rostrup & F. Kölpin Ravn Tidsskr. f. Planteavl. 22: 267〜296. (1951) (Centralbl. f. Bakt. II, 52: 254).
7) Reed, G. M.: Miss. Agr. Exp. Sta., 131: 469〜470. (1915).
8) Smith. H. C. & J. O. Blair: Ann. Appl. Biol., 37: 570〜583. (1950).
9) Stutzer, A.: Fühlings Landw. Zeit., 66: 130. (1917).
10) Trelease, S. F. & H. M. Trelease: Bull. Torr. Bot. Club, 55: 41〜67. (1928).
11) Vidali, A. & R. Ciferri: Tobacco, 55: 95〜102. (1951). (Rev. Appl. Myc., 30: 633).

Summary

This paper deals with the results of inoculation experiments, in which the excised first leaves of barley seedlings were inoculated with conidia of race 1 of *Erysiphe graminis hordei*, the basal parts of the leaves being inserted in water or 0.01〜0.015 mol solutions of certain inorganic salts.

1. When the leaves are inserted in water, the first haustorium of the mildew colony is formed more easily in the auxiliary cell than in the ordinary epidermal cell. Frequency of the initial infection of auxiliary-cell by the first haustorium may attain as high as 90 per cent of the total infections.

2. The liability of the auxiliary-cell to initial infection seems to be not necessarily connected with movement of the stoma, nor with the thickness of the outer wall or the sunken position of the auxiliary cell.

3. Solutions of calcium salts increased remarkably mildew susceptibility of the leaves. It is worthly to mention that the initial infections of ordinary epidernal cells increase notably in number, hence the frequency ratio

of the auxiliary-cell-infection by the first haustorium falls. At higher concentrations (0.04 or 0.07 mol) of calcium salts, the effect was more conspicuous.

4. Similar effects by calcium salts were observed when conidia of a different race (IX) and of the Agropyron mildew were used as inocula.

5. Magnesium chloride increased susceptibility, but less than calcium salts, while barium chloride decreased it. Potassium and soda salts exerted no marked influence upon susceptibility, while lithium chloride furnished with remarkable rsistance. Ammonium salts increased resistance in some instances.

6. Mixed solutions of calcium salts with potassium or soda salts caused intermediate influence upon susceptibility. Lithium chloride has a strong antagonistic action to calcium salts.

7. Darkening the leaves or washing them with running water showed similar, but less effects with calcium salts.

(Fac. Agr., Niigata Univ.)

文 献 紹 介

アネモネのバイラス病

アネモネのバイラス病としては Klebahn (1926, 31, 36 年)が報告した Anemone alloiphylly virus と Smith, K. M. (1957 年) が Textbook にあげた Anemone latenti vrus の2種があるが，更にイギリスのアネモネ栽培地 Devon 地方に蔓延しているバイラスが追加された。Hollings(Ann. appl. Biol., 45: 44～61. 1957) によると同地方圃場での病徴は 1)葉に mottle と奇形を，花弁にもふいりや奇形を生ずる 2)aucuba 型で葉に鮮明な黄色の mottle をつくり，花のふいりは軽微である 3)葉縁が上方にcurl し，所謂 crinkle 症状を呈するの3つの型がある。これらを数種植物に汁液接種した所 2) からはキュウリ・モザイク・バイラス(CMV)が分離され 1)からは未知のアネモネ・モザイク・バイラス(AMV)と時にCMVが得られた。3)はAMVとCMVの両者が重複していた。そこでAMVについて調べた結果，この virus は汁液接種の他，アブラムシ伝搬も可能で6種中4種のアブラムシが non-persistent 型の伝搬をした。土壌伝染は行わない。90種の植物の中 47 種の相当広い植物に寄生性があり，アカザ，ヒユ，ヒマワリなどには locai lesion をつくる。特にナタネ科植物に寄生性がみられ，キャベツなどの病徴からみると Cabbage black ringspot virus (CBRSV) に近いもののようであつた。物理的性質の中，耐熱性は62°C 以下，耐稀釈性は 2,500 倍以下，耐保存性は 72 時間以下である。X体も観察され 11～23μ の大きさで1細胞中に1個ある場合が大部分であつた。AMV，CBRSV の血清をつくり調べると血清学的には両者は近縁のようではあつたが，ハクサイ，ペチュニアなどで行つた cross protection test では類縁関係は示されなかつた。数種植物への寄生性或いは病徴，更に電子顕微鏡観察（CBRSVでは棒状粒子がみられたがAMVでは何もみられなかつた）などの点で若干両 virus間に差はあるが綜合的には類似しておりCBRSAよりは Cabbage virus Aに一層近いものと考えている。圃場周辺の或種のキンポウゲ，ノボロギク，ナヅナからもこの virus は分離され，更にオランダから大量に送られてくるアネモネ球茎でも多数の本 virus に罹つているものを見出した。(小室康雄)

Tobacco ringspot virus による種子伝染と花粉不稔現象

Tobacco ringspot virus に罹つたタバコで種子伝染することは既に Valleau (1930) が指摘し，Henderson (1931) はタバコでは否定したが，ペチュニアでは約 20% の高率であることを認めている。最近Shepherd ら(Phytopath., 46: 358～362. 1956) はスイカの pimple disease (果実の表面に疣状突起を生ずる) が本 virus に起因することを明らかにした後，スイカとメロンを供試して種子伝染の有無をしらべたが結果は陰性であつた。一方，ダイズでは本 virus によつて bud blight 病をおこすが，Desjardins ら (Phytopath., 44: 86. 1954) が Lincoln 品種の罹病体種子でしらべた所，54, 78 % と高率の伝染を示した。播種後気温が上昇すると病徴がおさえられ外観健全となるが virus は保有していた。この virus に罹つたペチュニア，タバコの花粉は不稔のものが多く，Valleau (1941) によると種子重量は健全タバコの 10g に対し罹病体では 0～0.4g になつてしまうという。同氏(Phytopath., 41: 209～212. 1951) はナスの本 virus に感染し yellows の病徴を示しているものの花粉を 20% の乳酸で処理し検鏡したが，発育不全率は健全個体の 3% に比べ，18%，40% と可成り高率であつた。(小室康雄)

The influence of a pre-infectional heat treatment on the resistance of potato plant to *Phytophthora infestans*.

(Cell Physiological studies on resistance of potato plants to *Phytophthora infestans*. VIII)

Kohei TOMIYAMA*

1. Introduction

In the previous paper (2, 5, 6, 7, 8). it was shown that the cell content of potato varieties which are resistant to *Phytophthora infestans*, degenerates according to the following scheme when the cell is infected by the fungus.

Penetration of *P. infestans* ⟶ Acceleration of protoplasmic movements ⟶ Appearance of granules in Brownian motion ⟶ Death of the host cell (with a second arrow running from "Acceleration of protoplasmic movements" directly to "Death of the host cell")

In former experiments (9), to ascertain whether such a succession of cell physiological phenomena in the degeneration process was in a causative linkage or not, the influence was examined of a post-infectional treatment with 2, 4-dinitrophenol (DNP) on the hyper-sensitive reaction of a potato cell resistant to infection by *P. infestans*.

DNP is known to be an inhibitor of oxidative phosphorylation and to be poisonous to cytoplasmic streaming. In these experiments, it was found that the death of the invaded cell was remarkably delayed by the post-infectional DNP treatment. These results suggest that the energy liberated from respiratory process (11-14) is closely associated with the death of the infected cell. It is possible, however, that the direct effect of DNP upon the intracellular hyphae gives rise to the delay in the cell death. Therefore in the present experiments, it was planned to study the influence of a pre-infectional heat treatment, which seems to be not influential on the parasite, on the hyper-sensitive reaction of a potato plant cell to the infection of *P.infestans*.

Tochinai and Fukuchi (present author's former name) (1942) (4) showed that in the cells of the seedling of a certain cotton variety, which is resistant to cotton anthracnose when treated with hot water at 55°C for 30 sec. ∼2 min., hyphal invasion and development were rapid and flourishing. Gradinaroff (1943) (1) showed that living Duke of York and Ackersegen tubers exposed before inoculation to supramaximal temperatures (30°, 35°, 40° and 45°C) acquired a susceptible reaction to fungi incapable of attacking normal material, more particularly *R. stolonifer* and *F. culmorum*. On the other hand, the development of *P. infestans* on pre-treated susceptible tubers was scantier than on the control, indicating that a decline in vitality does not necessarily connote any weakening of resistance to late blight. Yarwood (1956) (16) showed recently that the susceptibility of beans to some viruses and fungi is reduced by a pre-infectional heat-treatment.

2. Experiments on the cortex layer cells of a petiole

a) The influence of a pre-infectional heat treatment on resistance.

Methods and Materials. A potato leaf petiole was cut longitudinally with a razor, and washed with running water in order to eliminate the contents of destroyed cells. It was shown by microscopic examination that almost all the cells of the cut surface were living. Petioles thus prepared were dipped in hot water for a certain time. After the materials had cooled, the cut surfaces were inoculated with zoospore suspension of race O of *P. infestans*, to which the potato variety 41089-8 used in present experiments has been proved to be resistant. The variety41089-8 has two resistant genes R1 and R4 (Takase (3)). The inoculated materials were kept in a petri dish at 19°C.

* Hokkaido National Agricultural Experiment Station

Results. The results obtained are shown in Tables 1 and 2.

On the cut surface of the untreated petiole, remarkable brown necrotic spots came out about a day after inoculation, and no sporulation was observed afterwards; on that of heat treated one, on theo ontrary, brown necrotic spots did not appear until about 1-2 days after inoculation, and a considerable amount of spores were produced.

b) The influence of a pre-infectional heat-treatment on the growth of intracellular hyphae.

Methods and Materials. On the same materials as described in the preceding section, microscopic examination was made of the growth of intracellular hyphae.

Table 1. Reactions of cortex cells of potato petioles treated with hot water for 5 minutes to the infection by *Phytophthora infestans.*

Temperature °C / Hrs. after inoculation	cont.	41.5	44.5	46.5	49.5	51.5	53.5	56.5	61.5
24	+	+	−	−	−	−	−	*	**
42	++	++	+	±	−	−	−		

Remarks: * ...... Discoloration began about one hour after heat treatment.
** ...... Discoloration began in the course of heat treatment.
+ ...... Necrotic brown lesions appeared.
− ...... No necrotic brown lesions appeared.
Sporulation ...... A considerable amount of spores was produced on the heat-treated petioles, but not on the control ones.

Table 2. The effects of different durations of pre-infectional heat treatment at 41.5°C on the reactions of petioles of potato plant to infection by *Phytophthora infestans.*

Duration of heat treatment (min.) / Hrs. after inoc.	Cont.	5	30	60
22	+	+	−	−
30	+	+	−	−
46	++	++	+	+

Remark: The marks are the same as in Table 1.

Five hours after inoculation, microscopical sections of the inoculated materials were prepared and fixed with formalin-acetic acid-alcohol, and then the length of intracellular hyphae was measured with a micrometer. As will be described in a later section, the penetration of the hyphae of *P. infestans* into the host cell occurs almost simultaneously in tissues of both heated and nonheated petioles. Therefore the values thus obtained may indicate the growth rate of the fungus in living cells.

Results. The results obtained are represented in Table 3.

Table 3. The length of intracellular hyphae of *Phytophthora infestans* in the cortex cells of potato petioles heated with hot water for 5 min. and in cells of untreated ones.

Treatments	Control (non-heated)	Heated at 46.5°C	Heated at 51.5°C
I (Means) *	18.69 (μ)	20.76 (μ)	20.59 (μ)
II 〃	24.83	21.46	21.94
III 〃	26.81	26.67	24.76
Means	23.44	22.96	22.43

Remark: * Number of observed cells were about 50～100.

It seems that the pre-infectional heat-treatments at 46.5°C and 51.5°C for five minutes exert no influence upon the growth rate of intracellular hyphae of *P. infestans* in the cortex cells of potato petiole.

c) The influence of a heat-treatment on the occurrence of protoplasmic strands.

Methods and Mateterials. Observation was made of the occurrence of protoplasmic strands (P. S.) in the cortex cells of the petioles heated with hot water at 46.5°C and 51.5°C according to the same methods as described in the former sections.

A microscopical section made from thus prepared materials was placed in the hanging drop under the cover glass maintained on the hole of section-preserving apparatus (described in a former paper (8)), which was devised for the purpose of keeping sections at constant temperature (at 23°C). Then the number of P. S. which appeared in the cells was counted.

Results. In the cells of a control (non-heated), striking appearances of P. S. s were noted. The P. S., on which an active streaming of cytoplasm was recognized, burst into view, and on some occasions altered their position and then in a short time, disappeared. Such an active appearance of P. S. in the control cells seems to be owing to the act of preparation, because

Table 4. The number of protoplasmic strands in the cortex cells of potato potioles heated with hot water at 46.5°C and 50°C for five minutes.

Treatments / Hrs. after treatment	Control (non-heated)		46.5°C		51.5°C	
	range	mean	range	mean	range	mean
(1 st exp.) 2	1–8	4.9	1–4	2.25	0	0
(2 nd exp.) 4	3–14	7.3	2–13	6.1	0–2	0.8
23	3–10	5.8	1–14	4.1	0	0

Remarks: 1) The figure shown is the number of P. S. which was observed at a look.
2) Ten cells were observed in each experiment.

the cells observed were those in the tissue of cut surface of the petiole.

The data shown in Table 4 indicate that the active appearance of P. S. in the control cells was inhibited remarkably by 5 minutes of treatment with hot water especially by the treatment at 51.5°C. It was ascertained by means of both vital staining with neutral red and plasmolysis with 0.5 Mol. sucrose solution that the cells treated for 5 minutes at 51.5°C were still living 23 hours after the treatment.

d) The influence of a pre-infectional heat-treatment on the time which elapsed from penetration of the fungus to hyper-sensitive death of the infected host cell.

Methods and Materials. To the cut surface of petioles prepared by the same methods as described in the former sections, a zoospore suspension of race O of *Phytophthora infestans* was inoculated. At a certain interval of time after inoculation, a microscopical section was made from the inoculated materials; then the state of the penetrating hyphae was observed.

An appressorium was considered as not having penetrated yet into the cell, when the first sign of penetration was not observable under the microscope.

From the graph obtained by plotting the percentages of penetrated cells per total cells attached by appressoria as ordinates and time as abscissas, the time required for the penetration of the fungus into the host cell may be deduced. Both the vital staining method with neutral red and recognition of the existence of P. S. was employed to ascertain the hyper-sensitive death of the infected cells.

These experiments were repeated five times.

Results. From Fig. 1, it seems to be clear that by a pre-infectional heat-treatment, the time required for penetration of the fungus was not affected while the death of the invaded cells was remarkably delayed.

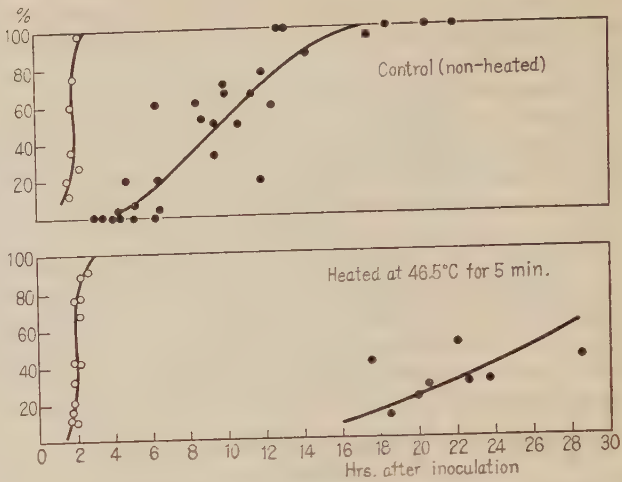
3. Experiments on slices of potato tuber

a) The influence of a pre-infectional heat-treatment on the resistance of the slice to *Phytophthora infestans*.

Methods and Meterials. A block of potato tuber was stamped out by a cork borer 22mm in diameter, and sliced 0.9 mm thick by means of microtome, and then washed with running water (12°C). The discs thus washed were inoculated with race O and race 1,4 of *P. infestans*: the former race is non-aggressive and the latter is aggressive to the potato variety "41089-8" used in the present experiments. The inoculated discs were kept in a petri dish at 19°C.

Results. In Tables 5 and 6, the results obtained are summarized.

The appearance of necrotic spots in the discs infected by incompatible stain (race O) was remarkably delayed under the influence of heat-treatment especially at 49°C ∼ 50°C, resulting in the production of a considerable amount of spores. Therefore it may be concluded that the pre-infectional heat-treatment reduces the resistance of tuber discs.



○…Percentages of penetrated cells per total cells attached by appressoria.

●…Percentages of dead cells per total cells infected by *P. infestans*.

Fig. 1. The influence of a pre-infectional heat-treatment on the penetration of the fungi into the host cell and the time elapsed from their penetration to the death of the infected host cells.

The spore production in the discs infected by compatible strain (race 1,4) was also increased by the heat-treatment.

b) The influence of a heat-treatment on the respiration of the slices.

Methods and Materials. About 40 - 60 minutes after slicing the potato tuber discs, prepared by the same method as in the former section, were dipped in hot water at 45°, 47.5° and 50°C for five minutes.

After heat-treatment, the discs were kept in a petri dish in the thermostat at 19°C. Then the respiration of the discs was measured by means of Warburg respirometer. Evolution of CO_2

Table 6. The reaction of potato tuber slices treated with hot water for 5 minutes to the infection of race O and race 1,4 of *P. infestans*.

Time after inoculation		Cont. race 0	Cont. race 1,4	49°C race 0	49°C race 1,4	50°C race 0	50°C race 1,4
Reaction	18 hrs.	—	—	—	—	—	—
	22 hrs.	±	—	—	—	—	—
	39 hrs.	++	—	±	—	±	—
Sporulation	5 days	non	rich	poor	very rich	poor	very rich

Remark: The marks are the same as in Table 5.

was determined by means of Warburg's "direct method". The solution in the Warburg flasks was 1/15 M. phosphate buffer of pH 5.3. The temperature of the water bath was maintained at 22°C. The potato variety used in the present experiments was "41089-8".

Results. The R. Q. s of potato tuber discs treated with hot water at 47.5°C and those of controls are shown in Table 5. No difference was found between the R.Q.s of the treated and non-treated discs about one day after heat-treatment.

As the R.Q.s of each plot were very close to 1.0, it may be permissible to draw conclusions on the respiratory drifts from the experiments on the O_2-uptake. The O_2-uptake of the discs are shown in Fig. 2. The respiratory rate was depressed remarkably by the heat-treatment, especially in the cases of comparatively higher temperature, and after a more or less continuous fall for some hours, it began to increase. About one day after treatment, the O_2-uptake of the

discs treated at 45°C have been restored almost completely, but those of the discs treated at the temperature higher than that were still lower than the O_2-uptake of the control.

Table 7. R. Q. s of the potato tuber discs treated with hot waters for five minutes.

Hrs. after heat-treatment*	Treatments	CO_2-output	O_2-uptake	R. Q.
21	Cont.	36.59	36.62	1.00
	47.5°C	22.86	22.81	1.00
25	Cont.	35.52	36.07	0.98
	47.5°C	23.04	23.94	0.96
26	Cont.	36.33	37.96	0.96
	47.5°C	31.65	32.50	0.97
Means	Cont.	36.15	36.87	0.98
	47.5°C	25.85	26.42	0.98

Remark: The hot water treatment was carried out about 1 hour after slicing.

4. Consideration

The results obtained from these experiments show that the respiratory rate of a potato tuber discs is depressed remarkably by a treatment with hot water, accompanied with reduction of resistance to infection by *Phytophthora infestans* The reduction of resistance was learned by the slower and weaker appearance of necrogenous reaction, and by an increased spore-production. Delay of necrogenous reaction by heat treatment seems to mean the delay of the death of infected cells. This presumption has been supported by microscopical observations on the cut surface cells of leaf petioles. The rate of delay of necrogenous reaction under the influence of the heat-treatment seems to go along with the rate of respiratory depression by the same treatment: in the case of the discs treated at temperatures lower than 47.5°C, the respiratory rate of which was restored with relative rapidity, the necrogenous reaction to the infection of the fungus occurred relatively earlier, comparing with that of the discs treated at 50°C, the respiratory rate of which was not easily restored. As both the time required for the establishment of penetration of the fungus into host cell, and the growth rate of the intracellular hyphae are not affected by the pre-infectional heat-tratment, it seems that the heat-treatment has some effect on hyper-sensitive death of infected cells, thus influencing the resistance. This presumption is favoured by the facts, shown in former reports (6,10), that the inhibition of growth of intracellular hyphae in the resistant host cell seems to occur for the first time after the death of the infected host cell.

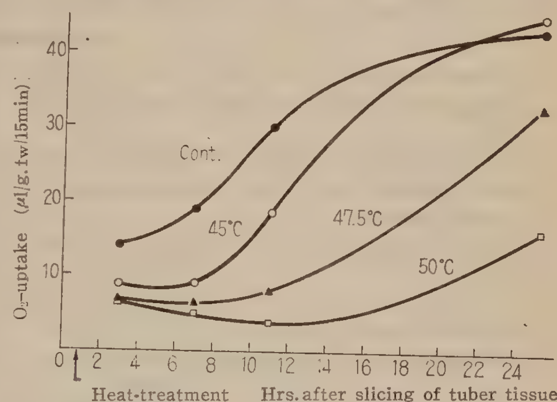


Fig. 2. Respiratory drifts of the slices treated with hot water for 5 minutes.

In the introduction of the present paper, the process of cell physiological changes induced by infection of *Phytophthora infestans* in resistant potato cells was shown schematically. As the present experiments showed that the occurrence of protoplasmic strands in the cells of cut surface of a petiole was inhibited by the heat-treatment, accompanied with the reduction of resistance to infection by *Phytophora infestans*, it seems to be plausibie that these processes are in a causative linkage with one another.

In one of the former reports it was shown that the death of potato plant cells infected by incompatible race of *Phytophthora infestans* was remarkably delayed by post-infectional 2, 4-DNP-treatment. In another paper, it was shown that when the discs of potato tuber, the respiratory rate of which had been accelerated by the act of slicing about one day after slicing of them, were inoculated with incompatible race of *Phytophthora infestans*, the hyper-sensitive death of

the infected cell was hastened.

From these results, it may be concluded that the hyper-sensitive death of the infected cell has a close connection with the metabolic activity in that cell.

The process of browning after the hyper-sensitive death of the infected cell was described in former papers (6, 15); the growth of intracellular hyphae is inhibited and followed by the death of hyphae, probably owing to the physiological action of metabolism in the neighbouring living cells, especially the deposition of polyphenol compounds and other materials in the infected cell.

5. Summary

1. Tissues of a potato petiole and slices of potato tuber were heated at 45°～53.5°C for five minutes, and then inoculated with *Phytophthora infestans*. The resistance of them to *P. infestans* was reduced remakably.

2. No influence of the heat-treatment on the time required for penetration of the fungus into the host cell, nor on the growth rate of the intracellular hypae was found by microscopical observations on the cortex cells of the petioles.

3. The necrogenous reaction of potato-plant tissue to infection by incompatible race of *Phytophthora infestans* was delayed remarkably by pre-infectional heat-treatment. The delay of the hypersensitive death of an infected cell was ascertained by microscopical observation on the cortex cells of the petioles.

4. The appearance of protoplasmic strands, in the cut-surface cell of a petiole was reduced remarkably by the heat-treatment.

5. The R.Q. of the potato tuber slice was not affected by the heat-treatment, but the respiratory rate was depressed remarkably by the same treatment. The rate of respiratory depression seems to go along with that of the reduction of resistance.

6. Basis was found for the supposition that the metabolic activity in the cell is closely associated with the hyper-sensitive death of infected cell.

(Received on June 25, 1957)

Literatures Cited

1) Gradinaroff, L.: Arb. biol. Anst. (Reichsanst.) Berl. XXIII: 405–428. (1943). (R.A.M. 23, 312)

2) Takakuwa, M. and K. Tomiyama: Res. Bull. Hokkaido Nat. Agr. Exp. Sta. Japan, 73: 94–99. (1957).

3) Takase, N.: Jap. Journ. Breeding, 7: 17–23. (1956).

4) Tochinai, Y. and K. Fukuchi: Journ. Sapporo Soc. Agr. and Forest. 35: 25–37. (1942).

5) Tomiyama, K.: Res. Bull. Hokkaido Nat. Agr. Exp. Sta. Japan, 67: 28–38. (1954).

6) ——: Ann. Phytopath. Soc. Japan, 19: 149–154. (1955).

7) ——: Ibid., 20: 165–169. (1956).

8) ——: Ibid., 21: 54–62. (1956).

9) ——: Ibid., 22: 75–78. (1957).

10) ——: Ibid., 22: 129–133. (1957).

11) Tomiyama, K., N. Takase, R. Sakai and M. Takakuwa.: Res. Bull. Hokkaido Nat. Agr. Exp. Sta. 71: 32–50. (1956).

12) ——, ——, ——and——: Ann. Phytopath. Soc. Japan, 20: 59–64. (1955).

13) ——, M. Takakuwa, N. Takase and R. Sakai: Ibid., 21: 17–22. (1956).

14) ——, R Sakai, N. Takase and M. Takakuwa: Ibid., 21: 153–158. (1957).

15) ——, M. Takakuwa and N. Takase: Ann. Phytopath. Soc. Jap. 21: 109. (1957); Phytopath. Ztschr. 31: 237–250. (1958).

16) Yarwood, C. E.: Phytopath., 46: 523–525. (1956)

馬鈴薯疫病抵抗性の細胞生理学的研究 VIII 疫病抵抗性に対する接種前熱処理の影響

富 山 宏 平

1) 馬鈴薯葉柄及び塊茎スライスの組織を5分間45～53.5°Cの温湯に浸漬し，冷却後疫病菌を接種した。抵抗性はこの処理で著しく低下した。

2) この処理は菌の侵入時間に影響しなかつた。また生細胞内の菌糸伸長速度にも影響しなかつた。

3) 菌侵入後の寄主植物の過敏感死時間は著しく遅延した。

4) 原形質糸の出現頻度は，この処理で著しく低下した。

5) 塊茎スライスのR.Q.はこの処理で影響されない(少なくも20時間後に)。また呼吸はこの処理で著しく低下し，且つ処理終了後もなお低下を続け，ある時間後に再び回復し始める。

6) 以上から疫病菌侵入に伴う寄主植物の過敏感死と代謝活性は密接な連関を持つと結論した。

稲白葉枯病菌ファージ (OP$_1$ ファージ) の乾燥不活化に対する種々の物質の保護効果*

脇 本 哲**

Satoshi WAKIMOTO: Protective effects of various materials against the drying inactivation of *Xanthomonas oryzae* phage (OP$_1$ phage).

1. 緒 言

ファージの溶液貯蔵の場合は雑菌繁殖に伴う不活化からファージを保護するため無菌的なる条件が絶対に必要である。またファージの溶液中における不活化は同一条件下においてもファージを含む液の種類により著しい差異があり，アミノ酸，蛋白，糖類及び若干の無機塩類を含む微生物の増殖に好適な培地に浮游させた方が活性の保存が良好であり，更に耐熱性も大であることは既報[4]でのべた。バクテリオファアージの保存は，従つて，種々の栄養分を含む増強液を限外沪過或は遠沈することにより無菌的にし低温保存するのが普通であり，或は溶菌斑の形成されたシャーレをそのまま冷蔵し必要に応じて溶菌斑からファージを分離して使用するのが普通である。然し前者はザイツ，シャンベルランなどの細菌沪過器を通すことにより数分の1ないし数千分の1に力価の低下がみられ，また一方遠沈操作などにより，力価の減少を防ぎ而も完全に無菌的に貯蔵できたとしても，なお冷蔵中にファージの力価は漸次低下し，常に安定な力価のファージ液を供給することはでき難く，また後者は冷蔵中に寒天が漸次乾燥しファージも不活化するため数十日毎に更新する必要があり，前者と同様に常に一定の高力価のファージ液を供給するわけにゆかない。

一定の高力価のファージ液が供給できれば，バクテリオファージによるバクテリヤの定量[6]の際，及びバクテリオファージにより多くの試料中のバクテリヤ数を比較しようとする際[7]に極めて便利である。またファージの種類系統を多数保存する必要のある場合も度々の更新は容易でなく，より簡単な長期保存法が望まれる。

筆者は多種類のファージの保存と，更に必要な時に常に高い一定の力価のファージ液が供給できるようにする為の最も適当な保存法の探索を直接の目的として本実験を行つた。

2. 実験材料及び共通の実験方法

稲白葉枯病菌ファージ (OP$_1$) を使用し，種々の乾燥処理前後におけるファージの力価測定には指示菌として稲白葉枯病菌 No.60 [6]の馬鈴薯半合成培地[4]斜面での 30°C 48 時間培養菌を使用した。

常温真空乾燥法： シヤーレ中に丁度入る大きさの沪紙を敷き，これにカバーグラス (1.8 cm^2) を並べ，その上に種々の物質に混じたファージの原液を 0.01mlずつ滴下してデシケーター中に入れ，200l/min の真空ポンプで2時間吸引し完全に乾燥させる。乾燥直後または真空中で一定期間冷蔵後取出し乾燥試料の乗つたそれぞれのカバーグラスを1ml ずつの殺菌蒸溜水と共に乳鉢中で磨粋し，その磨砕液の 0.01ml (即ちD$_1$0.01ml)或はその 100 倍稀釈液からの0.01ml (即ちD$_2$0.01ml) を取り常法に従つて稲白葉枯病菌 No.60 を指示菌として平板に流し，30°C，10〜20 時間後に生じた溶菌斑を計数してファージの力価を知り保存性を比較した。

冷凍真空乾燥法†： CaVfCh 培地[4]または馬鈴薯半合成培地[4]で増強したファージ液或は保護効果を検べようとする物質の溶液と混じたファージ液を真空冷凍乾燥用特殊瓶 (Fig.1) に1ml ずつ入れ，共和式 RH 1000 型冷凍真空乾燥機により，−40°C 前後に凍結後約6時間真空乾燥し，真空のまま密栓し 5°C前後の低温で貯蔵し，ファージの力価測定の際1個ずつ取出し1ml の殺菌蒸溜水で復元し，その力価を常法により測定した。

常温常圧乾燥法： 真空乾燥法の場合と略同様であるが唯真空ポンプを使用せずデシケーター中でそのまま乾燥させた。

---

* 九州大学農学部植物病理学教室業績，本実験の御指導と論文の御校閲を頂いた吉井甫教授に深謝の意を表する。

** 九州大学農学部

† 凍結乾燥に際し御指導頂いた九州大学農学部船津勝助教授及び船津軍喜氏に謝意を表する。



Fig. 1

Special bottles used for preserving the freeze-dried materials under vacuum.

A : Freeze-dried OP_1 phage from the suspension of 0.001 per cent gelatin.

B : Freeze-dried OP_1phage from the suspension of o.1 per cent gelatin hydrolysate.

C : Freeze-dried OP_1phage from the suspension of semi-synthetic media.

D : Freeze-dried filter paper saturated with OP_1 phage suspended in semi-synthetic media.

結　果

Table 1

Preservation of OP_1 phage activity under various drying conditions, with various added materials.

Methods for drying	Phages mixed with	Plaque counts per D₁† 0.01 ml: Before drying	Days after drying: 0	2	5	24	30	60	120	180
F.D.*	CaVfCh media	8200	125	/	/	/	0	0	0	0
	Semi-synthetic media	101000	53500	/	/	/	44700	46600	43800	46500
	Gelatin hydrolysate (10%)	2750	2540	/	2550	2780	/	/	/	/
	Gelatin (1%)	do	1800	/	1540	1400	/	/	/	/
	Distilled water	do	118	/	12	5	/	/	/	/
V.D.*	CaVfCh media	23400	520	0	0	0	/	/	/	/
	Semi-synthetic media	do	10800	10500	7600	6500	/	/	/	/
	Gelatin hydrolysate (10%)	2750	1520	/	1400	1480	/	/	/	/
	Gelatin (1%)	do	610	/	520	560	/	/	/	/
	Distilled water	do	4	/	0	0	/	/	/	/
O.D.*	CaVfCh media	23400	/	80	0	0	/	/	/	/
	Semi-synthetic media	do	/	18000	12100	4600	/	/	/	/
	Gelatin hydrolysate (10%)	2750	/	171	7	/	/	/	/	/
	Gelatin (1%)	do	/	10	0	/	/	/	/	/
	Distilled water	do	/	0	0	/	/	/	/	/

Figures are the average number of plaques produced in three plates.

* F.D. : Freeze drying, V.D. : Vacuum drying, O.D. : Ordinary drying within desiccator

† Solutions diluted one hundred folds with distilled water.

(1) 乾燥方法の差異及び培地の差異とファージ不活化との関係

異った3種の乾燥方法，即ち，冷凍真空乾燥，常温真空乾燥及び常温常圧乾燥により，異った培地，即ちCaVfCh培地，馬鈴薯半合成培地，ゼラチン溶液(0.01g/ml)，ゼラチン加水分解液(0.1gゼラチン/ml) 及

び対照として蒸溜水中に存在するファージを乾燥させた場合の力価の変化を一定期間後測定し比較した。行つた実験区分及びその結果はTable 1 のようである。

Table 1 より特に生存率の高いのは冷凍真空乾燥である。常圧乾燥によれば培地の種類をとわず保存不可能のようである。またほゞ肉眼的に乾燥した後真空中に移して冷蔵すれば概して真空乾燥の場合と変りないようである。乾燥の際の不活化と最も関係の深いのはファージを含む培地の種類である。 CaVfCh 培地は蒸溜水中に 10 %カゼイン加水分解物を 0.2 %の割合に含ませ更に $CaCl_2$ を 0.05 % になるように添加した培地であり，馬鈴薯半合成培地は馬鈴薯煎汁にペプトン，蔗糖の他若干の無機塩類を含んだ培地である。ファージを含んだ液が後者の場合には前者の場合に比し何れの乾燥方法によるもファージの保護効果が大であり，特に冷凍乾燥の場合は長期間殆んど力価に変化がみられない。

(2) 真空乾燥によるファージ不活化に対する異種蛋白及び糖類の保護効果

異種の蛋白，糖類及びアミノ酸その他無機塩類を多量に含んだ馬鈴薯半合成培地はファージの液体保存の場合にも有効に保護効果を示すことは既報[4] の通りであるが，乾燥によるファージ不活化の際にも CaVfCh 培地よりも保護効果が大であり更に以後の活性維持も良好であることが証明された。然らば如何なる物質が乾燥の際ファージの保護作用を示すのであろうか。

種々の蛋白保護剤の内の数種につき，乾燥の際のファージの保護効果を比較した。使用した物質は蛋白としてゼラチン，アルブミン，糖類として可溶性澱粉，蔗糖，葡萄糖，その他にアラビヤゴム及びゼラチン加水分解物，対照として馬鈴薯半合成培地及び蒸溜水を使用した。ゼラチン加水分解物はゼラチンを20.5% の HCl で 25 時間加水分解し減圧蒸溜により HCl の大部分を除いた後濃厚な苛性ソーダ液で pH7.0 としたものである。結果は Table 2 に示した。

Table 2 より，乾燥の際のファージ活性保護のためには蛋白が有効であり，用いた糖類はすべてその効果のないことが明らかである。従つてアラビヤゴムはその中に含まれていると思われる或種の蛋白により保護効果を示したものと考えられる。ゼラチン加水分解物の効果が最も著しいことは，これらの物質のファージ保護の機構が単に液気界面に形成される蛋白単分子膜の効果のみではないことを想像させる。

(3) 真空乾燥によるファージ不活化に対する各種濃度のゼラチンの保護効果

蛋白のファージ保護の機構は，液気界面における蛋白の単分子膜の形成によりファージの界面変性による不活化を防止することにあるとされている[1]。ゼラチンの存在は OP_1 ファージの乾燥不活化を防ぐことが判明したので，その濃度との関係を検討した。実験に用いたゼラチンの濃度とその効果は Table 3 の如くである。

即ち Table 3 より，ゼラチンの濃度は 10^{-3}g/ml 以上において保護効果が顕著である。然しながら 10^{-1}g/ml 以上の濃度では常温において凝固するため不便である。従つてファージ保護の目的で添加する場合は10^{-3}～10^{-2}g/ml になるようにするのが適当である。

Table 2

Protective effects of various materials against inactivation of OP_1 phage under vacuum drying.

Materials	Concentration (g/ml)	Plaque counts per D_1 0.01 ml		Per cent survived
		Before drying	After drying	
Gelatin	2×10^{-2}	5100	1030	20
Albumin	do	do	1140	22
Soluble starch	do	do	1	0
Sucrose	do	do	1	0
Glucose	do	do	7	0
Gum alabic	1×10^{-1}	1435	320	22
Gelatin hydrolysate	do	1435	735	51
Semi-synthetic media	……	5100	1850	36
Distilled water	……	1435	8	0

Plaque counts are the average numbers of plaques produced in three plates

Table 3

Protective effects of varied concentrations of gelatin against inactivation of OP_1 phage under vacuum drying.

Concentration (g/ml)	Plaque counts per D_1 0.01ml		Per cent survived
	Before drying	Five days after drying	
10^{-1}	4400	885	20
10^{-2}	do	865	20
10^{-3}	do	825	19
10^{-4}	do	215	5
10^{-5}	do	21	1
0	do	29	1

Plaque counts are the average numbers of plaques produced in three plates.

(4) 真空乾燥によるファージ不活化に対するゼラチン加水分解物の保護効果

ゼラチン加水分解物の方が生のゼラチンよりも保護効果の大きいことが判明したので下記の如き各種の分解程度のゼラチン加水分解物を作りその保護効果を比較した。

1）3倍量の 20.5 %HCl で25時間加水分解後減圧で大部分の HCl を除去，濃厚 NaOH 液で中和，pH7.0 とし最終濃度を 10^{-1}g/ml とす。

2）3倍量の 20.5 %HCl で 2 時間加水分解，他は 1 と同様。

3）3倍量の 10 %HClで6時間加水分解，他は1，2と同様。

4）3倍量の 10 %HCl で 2 時間加水分解，他は前と同様。

これらの対照として 10^{-2}g/ml のゼラチン溶液を用いたものを設け実験した結果，真空乾燥により1，2，3，4は何れも約 70 %の保護効果を示し相互間には全く差が認められなかつたのに比し，ゼラチンは約 35 %の保護効果しか示さなかつた。ペーパークロマトグラフによりこれらの分解程度を比較してみると，10 %HCl 2時間加水分解したものでは分解が特に完全でなく，その他のものに比較して多くのニンヒドリン発色スポットを現わした，即ち中間分解物即ち多くのペプタイドを含むものと考えられる。

然しながらペーパークロマトグラフにより完全にアミノ酸に分解されていることを確認した市販カゼイン加水分解物（東芝化学製）も尚よく顕著な保護効果を示すことは Table 4 より明らかである。

即ち保護効果には純アミノ酸もあずかつて力のあることを如実に示しているものと考えられる。

またゼラチン加水分解物（20.5 % HCl 2時間）の各種濃度について保護効果を検討した結果はTable 5の如くである。

これらゼラチン加水分解物中には中和に伴つて生ずる NaCl を多量に含むので，この NaCl の効果の有無を確かめるため，また試みに $CaCl_2$ をも含めて実験し，これら無機塩類の効果を検討した。結果はTable 6 のようである。

Table 6 より加水分解物中に含まれる NaCl，及び $CaCl_2$ はそれ自体は保護効果を示さないことが明らかである。

(5) 真空乾燥によるファージ不活化に対するゼラチン構成アミノ酸の保護効果

生のゼラチンよりもその加水分解物の方がファージの保護作用が著しく大であり，殆んど完全に分解されたゼ

Table 4

Protective effects of gelatin hydrolysates against inactivation of OP_1 phage under vacuum drying.

Materials	Concentration (g/ml)	Plaque counts per D_1 0.01ml		Per cent survived
		Before drying	after drying	
Vitamin free casein hydrolysate (Toshiba)	10^{-1}	528	221	42
Casein hydrolysate*	10^{-1}	do	213	40
Gelatin hydrolysate*	10^{-1}	do	315	60

* : Proteins were hydrolyzed for about two hours with 10 per cent hydrochloric acid.

Table 5

Protective effects of varied concentrations of gelatin hydrolysate against the inactivation of OP_1 phage under vacuum drying.

Concentration of gelatin hydrolysate (g/ml)	Plaque counts per D_1 0.01 ml		Per cent survived
	Before drying	After drying	
10^{-1}	1095	675	62
10^{-2}	do	435	40
10^{-3}	do	193	18
10^{-4}	do	1	0
10^{-5}	do	4	0
Distilled water	do	2	0

Figures are the average numbers of plaques produced in two plates.

Table 6

Protective effects of varied concentrations of sodium chloride against inactivation of OP_1 phage under vacuum drying.

Concentration of NaCl solutions (g/ml)	Plaque counts per D_1 0.01 ml	
	Before drying	After drying
10^{-1}	468	0
10^{-2}	do	1
10^{-3}	do	1
10^{-4}	do	0
Distilled water	do	0
$CaCl_2$ 10^{-1} g/ml	do	0

Figures are the average numbers of plaques produced in three plates.

Table 7

Constitution of the mixed amino acids used for testing the protective effect against inactivation of OP_1 phage under vacuum drying.

Amino acids	Concentration (g/l)	Amino acids	Concentration (g/l)
Glycine	26.9	Serine	3.2
Alanine	9.3	Threonine	2.2
Valine	3.3	Methionine	0.9
Leucine	3.4	Arginine	8.6
Isoleucine	1.8	Histidine	0.7
Proline	14.8	Lysine	4.6
Hydroxyproline	14.5	Hydroxylysine	......
Phenylalanine	2.6	Aspartic acid	6.7
Tyrosine	1.0	Glutamic acid	11.2

pH 7.2

ラチン及びカゼインにおける充分なる保護効果は蛋白或はペプタイドの単なる単分子膜形成によるファージの界面変性よりの保護のみではなく，アミノ酸もファージ粒子へ可逆的に結合することにより乾燥即ち全粒子が界面にさらされる現象でのファージの不活化から保護する作用を持つているものと考え，ゼラチン構成アミノ酸 (Hydroxylysine を除く) をその構成割合に混じ NaOH により pH7.2 とし乾燥の際の保護効果を検した。使用したアミノ酸の種類と割合は Table 7 のようである。その保護効果の実験結果は Table 8 のようである。

Table 8 からゼラチンの割合に混合した純粋のアミノ酸によつても相当程度の保護効果があることが明らかになつた。

(6) 真空乾燥によるファージ不活化に対する個々のアミノ酸の保護効果

ゼラチン構成アミノ酸で真空乾燥に伴うファージの不活化がかなり阻止されることを証明したが，更にこの構成アミノ酸がすべて同様に保護作用を示すものか，或はそれらの中の特殊のアミノ酸のみが現わす効果であるかを明らかにするため，Table 7 のそれぞれのアミノ酸を 2×10^{-2}g/ml になるようにし，これにファージを加えて真空乾燥を行つた。その結果はTable 9 の如くである。

ゼラチン構成アミノ酸の内 Leusine と Tyrosine は，pH7.2 において難溶の為用いなかつた。Table 9 から

Table 8

Pretective effects of the mixed amino acids which constitute gelatin hydrolysate against the inactivation of OP_1 phage under vacuum drying.

Materials	Plaque counts per D_1 0.01 ml		Per cent survived
	Before drying	After drying	
Mixed amino acids	13800	2600	19
Gelatin hydrolysate	do	6900	50
Distilled water	do	8	0

Figures are the average numbers of plaques produced in three plates.

Table 9

Protective effects of various amino acids contained in gelatin hydrolysate against inactivation of OP_1 phage under vacuum drying.

Amino acids	Concentration (g/ml)	Plaque counts per D_1 0.01 ml		
		Before drying	Just after drying	Four days after drying
Glycine	2×10^{-2}	4300	485	55
Alanine	do	do	68	2
Valine	do	do	0	1
Isoleucine	do	do	0	0
Proline	do	do	54	1
Hydroxyproline	do	do	0	1
Phenylalanine	do	do	0	0
Serine	do	do	3	2
Threonine	do	do	11	7
Methionine	do	do	2	1
Arginine	do	do	0	0
Histidine	do	do	430	435
Lysine	do	do	27	11
Aspartic acid	do	do	136	160
Glutamic acid	do	do	260	285
Dist. water	......	do	1	0

Each solution was adjusted to pH7.2 with NaOH. Figures are the average numbers of plaques produced in two plates.

アミノ酸の保護効果は特異的なものでありすべてが同一の作用を示すものではないことが判明した。而して Glycine, Alanine 及び Proline は乾燥直後は或程度の保護効果を示すが貯蔵期間中にその効果は著しく失われる。これに比し Histidine, Asparticе acid 及び Glutamic acid は乾燥直後から永く顕著な保護効果を維持する。その他 Threomine, Lysine, Serine 及び Methionine も微弱ながら効果を示すようである。Valine, Isoleusine, Hydroxyproline, Phenylalanine, Arginine などは全く効果を示さない。

(7) 冷凍真空乾燥によるファージの活性保存

馬鈴薯半合成培地に増強したファージまたはゼラチン，ゼラチン加水分解物などと混じたファージは冷凍乾燥後においても半分以上の力価が保存されるが，真空中で冷蔵すれば以後長期間にわたり全く力価に変化が見られないことが明らかになつた。多くのファージ系統を一定の力価の下に保存しようとする場合，従つてこれらと混じたファージ液を特殊瓶(Fig. 1)に入れて冷凍乾燥し真空低温保存するのが便利である。

単なる保存が主目的で而も屢々取出して使用する必要或は郵送の必要のある場合などは，馬鈴薯半合成培地増強ファージ液を約 1 cm^2 の沪紙に吸わせ特殊瓶に入れて冷凍乾燥すれば乾燥後も特に強い吸湿性はなく便利である (Fig. 1, D)。必要に際して1枚ずつ取出して使用できる。生否の判別は OP_1 にあつては稲白葉枯病菌 No. 60 の平板上にこの沪紙を置き 30°C に数ないし十数時間保ち，沪紙の周囲に阻止帯が作られるか否かで行う(Fig. 2)。

使用の為取出す際に真空は破れるが，馬鈴薯半合成培地と共に冷凍乾燥し外気と完全に遮断して湿気を防ぎながら冷蔵したものにあつては 1956 年 6 月 9 日の試料が 1957 年 11 月 23 日現在なお完全に活性を維持している。

3. 論 議

一般に蛋白は界面において変性する。このいわゆる界面変性 (surface denaturation) の機構は界面張

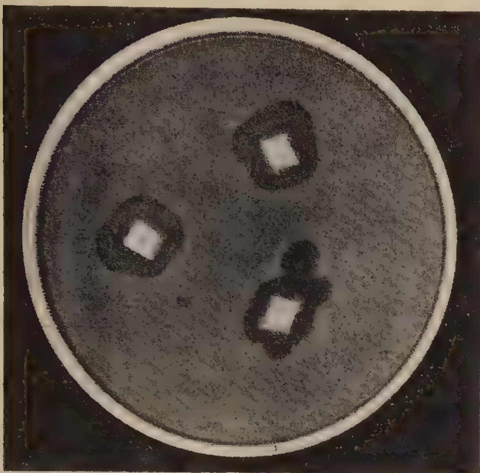


Fig. 2

Freeze-dried OP_1 phages mixed with semi-synthetic media and impregnated to filter paper are still active after 17 months of storage in a refrigerator.

Plaques are produced around the paper disks on the plating culture of *Xanthomonas oryzae.*

力による蛋白のペプチド結合の非可逆的膨潤或は結合様式の変化によるとされている。液体中のバクテリオファージの不活化も略同様の現象が想像されている。Adams[1] は液気両相の界面においては気体の種類をとわず不活化が進行すること，従つて振盪その他による両相の界面の拡大はファージの不活化を促進することを報告し，更に生の異種蛋白の添加は界面に蛋白膜を作りこれがファージを界面変性から保護するものと説明している。

真空乾燥の場合は乾燥に伴いすべてのファージ粒子が気相と接すると考えるべきであろう。この時異種蛋白の存在は，液気両相の界面に数Åないし数十Åの蛋白単分子膜を作り，これが結局はファージ粒子を掩いファージと気相との直接の接触を阻止し，ファージを界面不活化から保護するものと考えられる。この観点に立てば，アラビヤゴムはそれに含まれる蛋白によりまたゼラチン，カゼインなどの加水分解物は単分子膜を当然作り得ると考えられる蛋白の不完全分解物即ち種々のペプタイドの混在にそれらの保護効果の根源を求めるべきであろう。然しながら馬鈴薯半合成培地，蛋白水解物などと共に冷凍真空乾燥或は常温真空乾燥したファージが乾燥直後から長期間力価に変化が見られないのに対し，CaVfCh 培地或は蒸溜水と共に乾燥させたファージは乾燥後も冷蔵期間中に次第にその活性が失われてゆく事実，また殆んど完全にアミノ酸に分解されたゼラチン及びカゼインの加水分解物が生の蛋白よりも保護効果の著しく大きいことなどから乾燥の際の不活化の保護機構は単に蛋白分子膜のみに帰し難いのではないかと考えられる。これは Luria[3] らの全く異つた方法，即ちX線によるファージの不活化に対して異種蛋白即ちゼラチン，アルブミンなどがよく保護する事実の証明，而も糖類などはその効果を示さないという報告，また著者[4] の培地の種類によるファージの耐熱性の変化などの証明からも首肯し得る。

著者は，或種のアミノ酸も可逆的によくファージ蛋白に結合し，乾燥に際してファージ活性基の保護の役割をなすものと考え，ゼラチン構成アミノ酸について実験した。ゼラチン (10^{-1} g/m*l*) の割合に混合されたその構成アミノ酸は 10^{-1}g/m*l* のゼラチン加水分解物の保護効果約 50 ％に比して劣るが，約 20 ％の保護効果を示し，更に個々のゼラチン構成アミノ酸の内ではHistidine, Aspartic acid 及び Glutamic acid の保護効果が大きく，貯蔵中もその効果が安定である。Glycine, Alanine 及び Proline も一時的に保護作用を示すが，減圧低温保存していても，その効果が長く続かず，40日後には既に大部分の保護作用を喪失する。これらの現象が如何なる機構により示されるのかはファージの活性基に関連した多くの面白い問題を提起するものと思われるが，現在の処明らかでない。

4. 要　約

稲白葉枯病菌ファージ（OP_1 ファージ）は蒸溜水と共に乾燥させるならば，冷凍真空乾燥，常温真空乾燥及び常温常圧乾燥などの何れの乾燥方法を選ぶともその直後に殆んどの活性を失い，以後貯蔵期間中にも次第に不活化する。然るにゼラチン，アルブミンなどの蛋白を 10^{-3}g/m*l* ～ 10^{-1}g/m*l* 程度含んだ液と共に乾燥させる場合は冷凍真空乾燥により約 60 ％，真空乾燥により約 20 ％のファージ活性を維持し，また10^{-1} g/m*l* 程度の濃厚なゼラチン或はカゼインなどの加水分解物と混じて冷凍乾燥させた場合はファージの活性はよく維持され 70 ％以上に及び，真空乾燥の場合も約 50 ％生存する。馬鈴薯半合成培地と混じて乾燥させた場合は冷凍真空乾燥，常温真空乾燥の何れによるも約 50 ％生存する。またゼラチン加水分解物中の個々の構成アミノ酸では 2 ％液において比較的よく保護するが，その効果の 1 時的なものは Glycine, Alanine 及び Proline であり， 4 日後においても尚保護効果を維持しているものは Histidine, Glutamic acid

及び Aspartic acid である。

OP_1 ファージの乾燥に際し蛋白，またはその分解産物の添加により不活化から保護される機構は，蛋白及びペプタイドによる単分子膜の形成と共に，これらのファージへの或種の結合によりその活性基を保護するものと考えられる。そして種々の糖類及び $CaCl_2$ ，NaCl などの無機塩類はこの作用を有しない。

ファージ類の保存には，従つて蛋白を 10^{-2}～10^{-3} g/ml 含む液或はそれらの加水分解物或はまた馬鈴薯半合成培地と共に冷凍真空乾燥させるのが最も便利で確実である。(1957 年 12 月 17 日受理)

引 用 文 献

1) Adams, M. H. : Jour. Gen. Physiol., 31 : 417～431. (1948).
2) Bull, H. B. and H. Neurath :Jour. Biol. Chem., 118: 160～163. (1937).
3) Luria, S. E. and F. M. Exner: Proc. Nat. Acad. Sci., 27: 370～375. (1941).
4) 脇本哲: 九大農学芸雑誌, 14: 485～493, (1954).
5) 脇本哲: 九大農学芸雑誌, 15: 151～160. (1955).
6) 脇本哲・吉井甫: 九大農学芸雑誌, 15: 161～169. (1955).
7) 脇本哲: 日植病報, 22: (1957)

Summary

This investigation deals with protective effects of several materials against inactivation of *Xanthomonas oryzae* phage (OP_1 phage) during desiccation.

OP_1 phage particles are mostly inactivated during any one of the following procedures : freeze-drying, vacuum drying, or drying in an ordinary desiccator under normal room temperatures, when the phage particles are suspended in distilled water. If the phage particles are suspended in a solution of protein such as gelatin or albumin, at a concentration of 10^{-3} gram per ml or more, about 70 per cent of the phage activity is protected in the case of freeze-drying, and 20 per cent in the case of vacuum drying.

Concentrated (10 per cent) solution of gelatin hydrolysate protects the phage activity almost completely against inactivation, in the case of freeze drying; 50 per cent or more, in the case of vacuum drying. When the phage particles are dried together with semi-synthetic media containing potato extract, peptone, sugar and certain inorganic salts, about half of the activity is protected in the case of freeze drying; about 35 to 40 per cent in the case of vacuum drying.

If the phage suspensions, are dried under ordinary atmospheric pressure and temperature, the phage activities decrease rapidly, even when protective materials are added (Table 1).

Ten per cent solution of mixed amino acids is equivalent to gelatin hydrolysate, protects ca. 20 per cent of the phage activity, in the case of vacuum drying (Table 8).

Among amino acids which constitute gelatin hydrolysate, glycine, alanine and proline(two per cent solution in each case)show a certain protective effect against inactivation of the phage, in the case of vacuum drying(Table 9).

Histidine, glutamic acid and aspartic acid (at the same concentration), protects 10 per cent, 6 per cent and 3 per cent, respectively, at pH 7.2.

These protective effects are retained for more then 4 days (Table 9).

Mode of action of these proteins, protein hydrolysates and amino acids in protecting the OP_1 phage against inactivation during drying procedures seems likely to be the protection of the phage particles, not only by forming protein- or peptide- monomolecular membrane, but also by somehow combining with active portions of the particles.

Neither carbohydrates such as soluble starch, sucrose, glucose, nor inorganic salts such as $CaCl_2$ and NaCl show protective effects.

For the preservation of the phages, the most favourable method is the freeze drying of the phages with 0.001 to 0.1 per cent solutions of protein, protein hydrolysate, or with semi-synthetic media. Phage preparations with constant high titres are thus available, whenever required.

(Faculty of Agriculture, Kyushu University)

イネゴマハガレ病における病斑の大きさの分布と抵抗性*

黒 崎 良 男**

Yoshio KUROSAKI: Über die Beziehung zwischen der Fleckengrößeverteilung und der Widerstandsfähigkeit von Reispflanzen bei der Helminthosporiose.

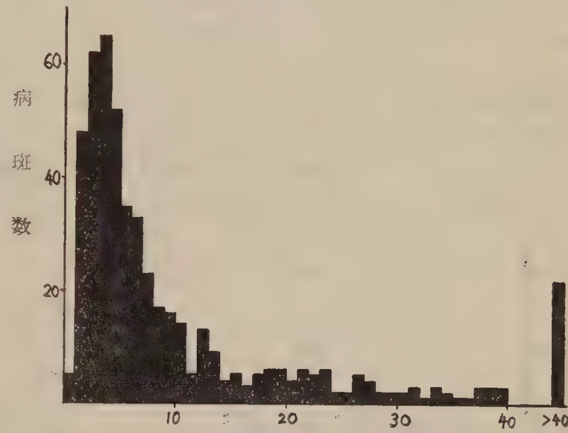
1. 緒 言

斑点性病害においては，病斑の大きさが寄主植物の拡大抵抗性を定量化する重要な指標になることは言をまたない。従つて，この分野に於ける研究者は，病斑の面積，長さ等を測定し，それに基ずいて夫々種々な様式によつて抵抗性を定量化してきた。しかしそれらの方法は統一性に欠けており，かつ便宜的なものが多いため，研究者自身も矛盾を感じている面が少くない。又接種試験の結果，肉眼では明かに差が認められても，それを数値にしてみると有意差が生じないという様な場合がある。この様な混乱は，病斑の大きさが如何なる分布に従うものか，又分布を支配する要因が何であるかということを的確に把握していないために起るものと考えられる。筆者は，イネゴマハガレ病についてその病斑の大きさを測定して分布図を作製し，あわせてそれを支配する要因を解明せんと試みた。

2. 病斑の大きさの分布型

第1図は，3寸鉢に育てた水稲品種朝日を用いてゴマハガレ病菌の接種試験を行い，生じた病斑の長さを顕微鏡下で測定して得られた分布図である。病斑の測定は接種時の上位第2葉中央部（中肋部を除く）に限つた。かつ中毒部を計らず，壊死部の長さを以て病斑長とした。

第1図で見られる様に，分布型は著しく左に歪んでいるのが特徴である。同じイネの第1葉や第3葉についても，結果は全く同様である。病斑の幅については，多少傾向を異にするが，やはり歪んだ分布になる。今，病斑の大きさが，イネ組織中で生育した菌糸の“コロニー”の大きさに等しいか，或は比例関係にあるとすれば，病斑の大きさもまた，生物一般の属性同様，正規分布に従つてもよい筈である。しかるに事実はそれに反して図の如く正規分布とはかなりかけはなれたものである。又病斑の長さを平方根，立方根，対数等で変数変換しても，簡単に正規型に移行させることができない。



第1図　ゴマハガレ病における病斑長の分布　稲品種：朝日，葉位：接種時の上位第二葉，1956年7月15日播種，9月8日接種，9月19日アルコールで固定。

3. 分布型を支配する要因

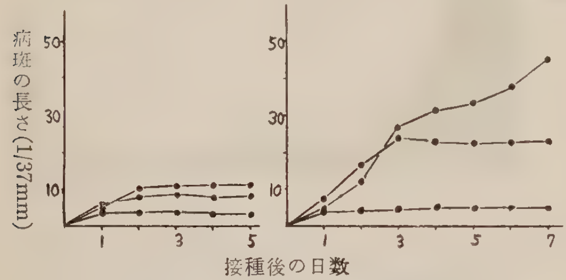
病斑の大きさを菌糸の“コロニー”の大きさと同様に考えるならば（以下の論議ではすべてこれを前提とする），病斑の大きさは菌糸の伸長する速度と，伸長を続ける期間との積で決定する。したがつて，伸長速度と伸長期間の両者が病斑の大きさの分布型を支配する要因となるのであるが，問題はこの両者の内，いずれがより支配的であるかという点である。かりに一方が圧倒的に優位に立つているのであれば，それ一つに還元して，それの分布を論じても大過ないことになる。さて今の場合，先ず伸長速度について考えてみよう。寄主組織中での菌糸の伸長速度を測ることは困難であり，又理論的にも意味をなさないことがあるので，in vitro の伸長速度を論ずることにする。ゴマハガレ病菌の胞子発芽試験で，発芽管の長さは多くの研究者によつて測定されている。それらによると，発

* 京都大学農学部植物病理学研究室業績　第 99 号

** 京都大学農学部植物病理学研究室

芽管の長さは一般に正規分布に従う様である。この場合，測定の前に固定されるのが常であるから伸長期間は各個体について殆んど等しい。したがつて発芽管の長さが正規分布に従うということは，発芽管の伸長速度が正規分布になるということである。もし伸長速度が分布を支配する主因であるならば，その分布も正規型に近ずかねばならないことになる。しかし事実は上述の通りであるので，今一方の伸長期間が主要因であるという可能性が濃くなつてくる。本論文では，この点について今少し詳しく論じてみよう。

病斑の伸長期間を実測するために，ゴマハガレ病菌接種後病斑が現れ始めた頃に，測定すべき病斑に印をつけ，それらについて毎日病斑の長さを測定した。こうして観察された病斑の伸長様式を第2図に示す。



(イ) 硫安過多のイネ (ロ) 標準肥料のイネ

第2図 病斑の伸長曲線

この図で見られる様に，伸長曲線は "staling" 型であつて，各病斑により伸長期間に著しい差が認められる。第2図では少数の典型的なものを選んで図示したのであるが，観察した病斑全部について，伸長期間と最終的長さで分類を行うと第1表の様になる。

第1表 伸長期間と長さによる病斑の分類
(数字は病斑数)

(イ) 硫安過多のイネ

病斑長$\left(\frac{1}{37}mm\right)$		5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
伸長期間(日)*	1	3	7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2	1	9	2	1	—	—	—	—	—	—	—	—
	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

(ロ) 標準肥料のイネ

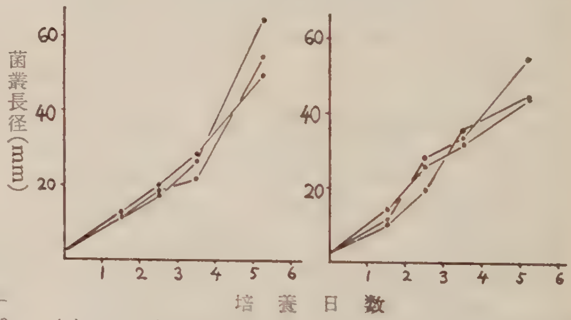
病斑長$\left(\frac{1}{37}mm\right)$		5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
伸長期間(日)*	1	2	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2	—	4	1	1	1	—	—	—	—	—	—	—
	3	—	—	—	1	1	1	3	—	—	—	—	—
	4	-	—	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—
	5	—	—	—			—	—	—	—	—	—	—
	6	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1
	7	-	—	1		—	—	—	—	—	—	1	—

* 最終値の 90 %に到達するに要した日数。(イ)(ロ)は夫々，第2図の(イ)(ロ)と同一材料。

この表でわかる如く，大きな病斑程伸長期間が長い。このことは，伸長曲線が "staling" 型であるということと同意義である。

以上により，病斑の大きさは伸長速度によるよりは，伸長期間によつて大部分が支配されることが明かである。また同一処理のイネ個体群の中のみならず，処理を異にして(硫安施用量による)抵抗性に差を生じた様な個体群との間の違いも，伸長期間の違いによることが，第1表の(イ)，(ロ)の比較によつて明かである。

一方培地上でのゴマハガレ病菌の生育曲線は，イネ組織中におけるそれとは全く異つており，1週間程度の培養期間では完全な "non staling" 型である。第2図と第3図との比較によつて，in vivo と in vitro の差が再認識される。即ち in vivo では伸長速度の絶対値がはるかに小さく，個体間の変異が大であり，曲線が "staling" 型である点 in vitro とは著しく異つている。この差をもたらすものがイネの抵抗性であることは言うまでもない。そして病斑の大きさの分布を支配するものもこの抵抗性に他ならない。



(a) 曲玉 (抵抗性中位) (b) ハワイ1号 (強抵抗性)

第3図 高温殺菌したイネ葉を培地とした場合のゴマハガレ病菌の生長曲線

4. 分布函数の導入

分布を支配する要因が明かになれば，これより演繹して理論的な分布函数を導入することが出来る。而してこれが実測値に適合するならば，その分布函数は統計的な意味をもつばかりでなく，その中に含まれるパラメーターは，病理学的具体性をそなえるようにな

る。以下はその一つの試みである。

今，胞子接種 t 時間後に寄主組織中に伸長を続ける病原個体が N_t あつたとする。時間 $t+\Delta t$ に於て，この個体数が $N_t+\Delta N_t$ ($\Delta N_t \leqq 0$) に減じたとする。即ち Δt 時間の間に寄主の抵抗性のために $-\Delta N_t$ 個の病原体が伸長を停止させられたとする。このとき，$-\Delta N_t/N_t\Delta t=\alpha_t$ とすれば，α_t は時間 t に於ける寄主の抵抗性を表わすことが出来る量である。本論文ではこの α を以て寄主の抵抗性と定義する。上の関係を書きなおせば（1）式の様になる。

$$-dN_t=\alpha_t N_t dt \quad \cdots\cdots(1)$$

ところで抵抗性に関する従来の知見によれば，α_t は特定の組織についても常数とは考えられず，接種後の時間 t の函数と考えるのが妥当である。故に $\alpha_t=f(t)$ とし，これを（1）に入れると，

$$-dN_t=f(t)N_t dt \quad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots(2)$$

$$\therefore \quad -\frac{1}{N_t}dN_t=f(t)dt$$

これは変数分離型の微分方程式であるから，直ちに積分して，

$$\log N_t=-F(t)+K \quad \text{但し} \quad F(t)=\int f(t)dt \quad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots(3)$$

$t=0$ に於て，$N_t=N_0$ とすれば $K=\log N_0+F(0)$

$$\therefore \quad \log N_t=-F(t)+\log N_0+F(0) \cdots\cdots(4)$$

$$\therefore \quad N_t=e^{-F(t)+\log N_0+F(0)}=N_0 e^{(F(0)-F(t))}$$

これを（2）に入れると

$$-dN_t=f(t)N_0 e^{(F(0)-F(t))}dt$$

ところで $-dN_t$ は時間 t に於て伸長を停止した個体数に相当するから $-dN_t/N_0$ はそれの全個体に対する割合となり，確率を表わす。確率密度を $\varphi(t)$ とすれば，

$$\varphi(t)dt=f(t)e^{(F(0)-F(t))}dt \quad \cdots\cdots(5)$$

次に病原菌の伸長速度を単位時間当り v とすれば，t 時間伸長を続けた病斑の長さ x は，$x=vt$ で表わされる。x が t の一次式で表わされる限り（5）の型は変らない。$v=1$ になる様に時間単位を選べば，（5）はそのまま求むる病斑の長さの分布函数を与える。

5. 分布函数の選定

$f(t)$ の選定に当つて，再び筆者の仮設にもどつてみる。即ち病斑の大きさはその伸長期間に比例するのであるから，第1図はそのまま伸長期間の分布図になる。したがつてそれから抵抗性の時間的推移が計算できる。何となれば筆者の定義した抵抗性 α_t は，

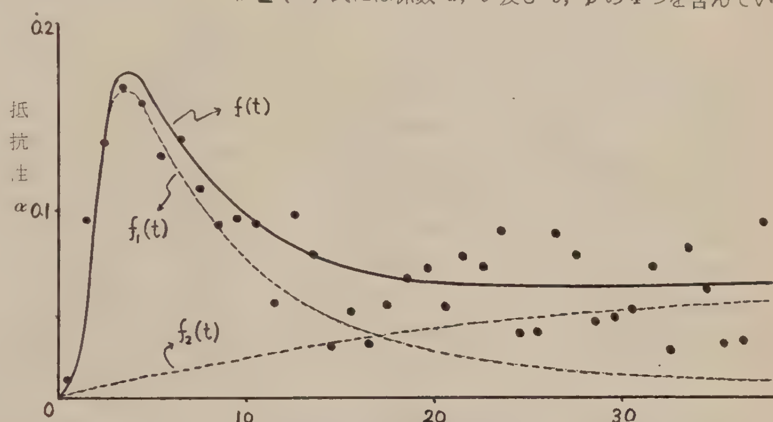
$\alpha_t=\dfrac{-\Delta N_t}{N_t\Delta t}$ であるから，$\Delta t=1$ にとつて，

$\alpha_t=-\Delta N_t/N_t$ を計算すればよい。その結果は第4図に黒点で示した通りである。尚実際の計算とその方法については第2表を参照されたい。

$f(t)$ としては，この実測点に近似する函数を選べばよいわけである。したがつてどんな型のものでもよいのであるが，適合度と演算の容易な点で次式を採用した。

$$\alpha=f(t)=\frac{ab}{t^2e^{b/t}}+c(1-e^{-pt}) \quad \cdots\cdots\cdots(6)$$

（6）式には係数 a，b 及び c，p の4つを含んでいる。



第4図　抵抗性の時間的推移と指数函数による近似曲線

$$f(t)=f_1(t)+f_2(t),\ f_1(t)=\frac{14.9}{t^2e^{7.0/t}},\ f_2(t)=0.08(1-e^{-0.08t})$$

これらを決定するのに単純な代数計算は困難であり，また最小自乗法の様に最尤値を求める方法もないので，まず係数の値を適当に決めて曲線を描き，実測点をよく近似するかどうかしらべ，適合度が充分でないときは改めて係数値を決めるという方法をとらねばならない。といつても全くの暗中模索ではなく，2，3の目やすがある。即ち先ず $f(t)$ と $f_1(t)$ が極大値をとる点を夫々 $\hat{t}$，$\hat{t}_1$ とすると，第4図で分る様に $\hat{t} \fallingdotseq \hat{t}_1$ であり，かつ $f(\hat{t})$ と $f_1(\hat{t}_1)$ も大差ない。そこで図より $\hat{t}_1=3.5$，$f_1(\hat{t}_1)=0.16$ と一応決める。$f_1(t)$ を微分して $\hat{t}_1=3.5$ を入れると0になるから $b=2\hat{t}_1=7.0$ が得られ，これより a も求まる。次に $f_1(t)$ は t が大きくなると0に近くなるので，t の大きいところでは $f(t) \fallingdotseq f_2(t)$ となる。故に $f(t)$ の漸近線の高さ

第2表　分布図から抵抗性の時間的推移を計算する方法と実際の計算例

t	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	>11
$-\Delta N_t$	5	48	62	65	52	35	33	23	17	16	14	137
N_t	507	502	454	392	327	275	240	207	184	167	151	—
α_t	0.010	0.096	0.137	0.166	0.159	0.127	0.137	0.111	0.093	0.096	0.093	—

t：　接種後の時間（第1図における横軸の目盛をそのまま流用する。このとき時間単位は約3時間となる。）

$-\Delta N_t$：　第1図で横軸を t におきかえて流用したときの，t に対する病斑数

$N_t=\sum_{t=t}^{\infty}-\Delta N_t$：　t において伸長を続けている病原体の数に一致する。

$\alpha_t=-\Delta N_t/N_t$：　t における寄主の抵抗性，但し t という瞬間的な時間ではなく，t から $t+1$ までの間の平均的な値。

尚紙面の都合で $t>11$ については省略したが計算法は全く同じである。t が大きくなるにつれて N_t が小さくなるので α_t の変動は激しくなる。

が c の値になることは $f_2(t)$ の形から直ちに分る。以上3つの係数を $f(t)$ に入れると，$f(t)$ は t と p の2つの未知数を含むだけとなるから，もう一つ適当な実測点 (t_2, α_2) をとつて代入すれば p が求まる。こうして求めた4つの係数値を基礎としてこれに多少修正を加えて，適合度のなるべく高いものを採用すればよい。筆者の計算例では次の通りになつた。

$a=2.13\quad b=7.0\quad c=0.08\quad p=0.03$

以上により(6)式を図示すれば第4図の実線となる。$f(t)$ が決つたからこれを (5) 式に代入して

$$\varphi(t)dt=\left\{\frac{14.9}{t^2e^{7.01t}}+0.08(1-e^{-0.03t})\right\}e^{(2.67-2.13e^{-7.01t}-2.67e^{-0.08t}-0.03t)}dt \quad \cdots\cdots(7)$$

分布図を作るための数値計算には次式の方がはるかに簡単である。即ち(5)式より

$$\int_0^t\varphi(t)dt=\int_0^t f(t)e^{\{F(0)-F(t)\}}dt=e^{F(0)}\left[-e^{-y}\right]_{F(0)}^{F(t)}$$

$$=1-e^{(2.13e^{-7.01t}+2.67e^{-0.08t}+0.03t-2.67)} \quad \cdots\cdots(8)$$

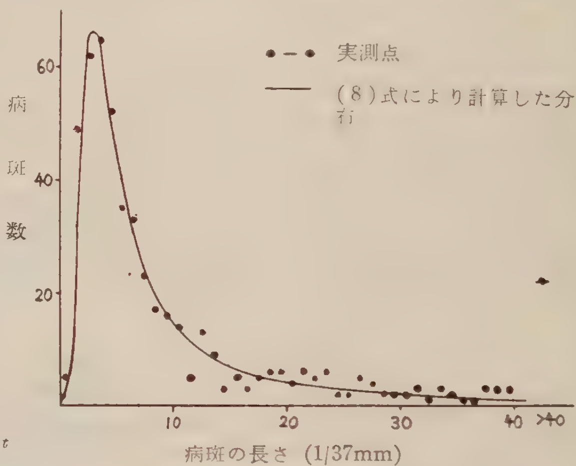
実際の計算に当つては，(8)式の e の羃項は小数第4位まで精確に求める必要がある。さもないと円めの影響が大きいので滑らかな曲線が得られない。

6. 実測値へのあてはめと適合度検定

(8)式により計算を行つて第1図の分布図にあてはめてみた結果は第5図の如くである。

尚この結果を χ^2 検定のために表にまとめれば第3表の様になる。

第3表より $\chi^2=23.8$ となる。ところでこの分布函数はいわゆる半経験的分布函数であつて，含まれているパラメーター a, b, c, p を実測値から求めることになつている。故にその自由度は第3表の階級数 20 から 1を引き，更にパラメーターの数4を引いたものとなる。但しここでは p だけが先にのべた計算法とは少しちがつて，直接第1図のデータから得たものではないので（この点は次報で説明の予定）結局実測値からきめたパラメーターの数は3となり，自由度は 16 となる。したがつて $\chi^2=23.8$に対する第一種の危険率は約 0.10 となる。この適合



第5図　実測値へのあてはめ

第3表　実測値と計算値の比較

病斑長	実測値	計算値	病斑長	実測値	計算値	病斑長	実測値	計算値
0～2	53	33	8～9	17	20	20～24	21	17
2～3	62	65	9～10	16	17	24～28	13	13
3～4	65	64	10～12	19	25	28～32	9	10
4～5	52	52	12～14	22	19	32～36	7	8
5～6	35	41	14～16	8	15	36～40	10	7
6～7	33	31	16～18	8	12	40～∞	22	22
7～8	23	25	18～20	12	10	計	507	506

度では必ずしも充分なものとはいえないが，病原菌伸長速度の変異を無視した点や，病斑長測定特に小病斑の測定の精度を考え合わせると，更にこれ以上の適合度を要求することは，それ自体疑問に思われる。

7. 考　　察

以上の論議を綜合してみると，その中心をなすものは，抵抗性を表わす函数 $f(t)$ の選定である。前提や

仮設がこれに集中しているからである。ところで検定の結果が満足なものであるからといつて，これらの仮設が事実として認めうるというのではない。例えば，第1図の分布図から計算された $-\Delta N_t/N_t$ が抵抗性そのものであると認めるわけにはゆかない。たゞ結果としてこれが抵抗性と相関の高いものであるということはいえるであろう。

さて抵抗性の函数である(6)式について少し説明を加えてみよう。これは次の如く2つの函数の和になる。

$$\alpha=f(t)=abt^{-2}e^{-b/t}+c(1-e^{-pt})=f_1(t)+f_2(t)$$

ここに $f_1(t)=abt^{-2}e^{-b/t}$ $f_2(t)=c(1-e^{-pt})$

函数として，こう解析されても，実際に2つの異質な抵抗反応が存在するかどうかは，大部分未知の問題であり，今後の研究にまたねばならない。この内 $f_1(t)$ は初期反応を表わすもので最も顕著なものである。これに含まれる係数中，b は初期反応の速さを表わし，a はその高まりの程度を表わす。$f_1(t)$ に関しては抵抗性に関する従来の知見と符合する。これに対して $f_2(t)$ は後期反応とでも称すべきもので，従来これに関しては殆んど注意が払われていない。ゴマハガレ病の様に，停止型の病斑が無数に生ずるのはこの反応のためであり，イモチ病の様に少数の進展型病斑によつて全個体が枯死するのは，この反応が欠けているためとも考えられる。農業生産と結びついた抵抗性の研究では，どちらかといえば，むしろ後期反応の方が大事であるかもしれない。この点現在学界の主力が初期の反応に集中されているのは片手落ではないだろうか。$f_2(t)$ の係数の内，p は反応の速さを表わし，c は最終的な高さを表わす。

抵抗性を異にするイネを対象とした場合，以上4つの係数が如何に変化するかについては，第2報で報告する予定である。

$f(t)$ 中には計4つの係数が含まれているが，近似式としては係数の数が少ない程価値が高い。N 個の測定値を近似するのに N 個の係数を使えば，どんなものでも出来るからである。ここでは4つの係数が全く独立に決められたのであるが，いうまでもなく，生体反応において相互に完全に独立な要素が存在するとは考え難い。ここで独立に決めた係数の間にも函数関係が存在するであろう。これらの解明のために解剖学や生化学をも含めた綜合的な研究をまたねばならないが，一方本論文で論じた様な数理統計的な追求が，他の方法論による研究を促進することになれば，筆者にとつては望外の喜びといわねばならない。

8. 摘　要

1．ゴマハガレ病の病斑の大きさの分布は正規分布に従わず，特異的な歪のある分布を示す。

2．この分布はイネ組織の抵抗性と関係があると考えれば説明できるので，抵抗性をもととした分布函数の導入を試みた。

3．拡大抵抗性 α_t を次の如く定義した。

$$\alpha_t=-\Delta N_t/N_t\Delta t$$

但し，接種後の時間 t において伸長中の病原体 N_t 個の内，続く Δt 時間内に $-\Delta N_t$ 個体だけが寄主の抵抗性のために伸長を停止させられたものとする。

4．抵抗性を上の如く定義すれば，病斑の長さの分布は次の確率密度をもつ。

$$\varphi(x)dx=f(x)e^{(F(0)-F(x))}dx$$

但し x は病斑の長さで，その単位長さを伸長するに要する時間を時間単位にとれば

$$\alpha_t=f(t)\quad F(t)=\int f(t)dt$$

5．$\alpha_t=f(t)$ としては次の指数函数が適当である。

$$f(t)=abt^{-2}e^{-b/t}+c(1-e^{-pt})$$

6．導入した分布函数は実測値によく適合する。したがつて病斑の大きさの分布から抵抗性の時間的推移を推論することが可能である。(1957年8月10日受理)

(1957年8月10日受理)

参 考 文 献

林　桂一：高等函数表，岩波書店，東京 (1941).

Zusammenfassung

1. Die Fleckengrößeverteilung bei der Helminthosporiose von Reispflanzen ist nicht normal, sondern eine ungewöhnliche Verteilung, die sich nach links stark verbiegt.

2. Eine theoretische Verteilungsfunktion wurde unter Voraussetzung eingeführt, daß die Verteilung von der Widerstandsfähigkeit des Reisgewebes abhängt.

3. Der Autor definierte die Ausbreitungsresistenz α_t wie folgend:

$\alpha_t=-\Delta N_t/N_t\Delta t$ wobei N_t das Zahl von Parasiten, die an Zeit t nach Infektion in den Wirtsgeweben wachsen, und $-\Delta N_t$ das Zahl von während Δt durch die Widerstandsfähigkeit des Wirtes gehemmten Parasiten ist.

4. Aus dieser Definition kommt die Wahr-

scheinlichkeitsdichte der Fleckenlängeverteilung wie in folgendem Ausdruck:

$\varphi(x)dx = f(x)e^{(F(o)-F(x))}dx$

wobei x Fleckenlänge ist; und wenn man die Einheit von t so wahlt, wie Wachstumsgeschwindigkeit der Flecke 1 wird, ist $f(t)=\alpha_t$ und $F(t) = \int f(t)\,dt$.

5. Als die Funktion $f(x)$ nahm der Autor eine Exponentialfunktion; das heißt,

$$f(x) = abx^{-2}e^{-\frac{b}{x}} + c\,(1-e^{-px})$$

6. Der durch diese Funktion gerechnete Wert stimmt mit dem ursprünglichen wohl überein; daraus geht vorher, daß die Fleckengrößeverteilung sich auf Widerstandsfähigkeit des Wirtes so eng bezieht, wie man durch die Verteilung den Ablauf der Widerstandsfähigkeit beschreiben kann.

(Institut für Phytopathologie, Universität zu Kyoto)

文献紹介

Dimethyldithiocarbamate の殺菌機構 (1)

Sijpesteyn, A.K. and G.J.M. Van der Kerk: Investigations on organic fungicides. IX. Certain imidazole derivatives and of α-keto acids on the fungitoxicity of dimethyldithiocarbamates. Biochim. Biophys. Acta, 915: 69～77. (1954).

殺菌剤 tetramethylthiuram disulfide (TMTD) と sodium dimethyl dithiocarbamate (NaDDC) は明らかに菌糸の生長は阻害しない筈の低濃度で菌胞子の発芽を抑制し，この抑制は L-histidine (LH) によつて打消されることがわかつている。そこで NaDDC の各段階稀釈液を *Aspergillus niger*(An) か *Penicillium italicum*(Pi) (場合によつては *Botrytis cinerea*(Bc) や *Rhizopus nigricans*(Rn) も) の胞子浮遊液に加えた合成寒天培地上での供試菌の生長反応を観察した。An は NaDDC が 1–5 ppm のとき (第1阻止帯) と 50 ppm 以上のとき (第2阻止帯) に生長が阻止されるが，その間の濃度では生長が起り (逆転生長帯) Pi も同様な現象を示したが，Bc と Rn では生長の逆転はみられなかつた。An と Pi に対しては imidazole Pyruvic acid(IPA), D-histidine L-histidinol, imidazole carboxylic acid は何れも LH と同様に第1阻止帯で競争的拮抗作用を示し特に IPA の作用は LH よりも強力であつた。しかしこれらの imidazole 誘導体は An の菌体内で LH には変換されないことが LH 欠乏変異株での実験で明らかになつた。又 IPA 以外の α-ケト酸即ち Pyruvic acid, α-ketoglutaric acid, dimethyl Pyruvic acid, 及び α-ketobutyric acid は An にのみ非競争的な拮抗作用を示した。これらの現象を考察した結果，NaDDC の濃度が増すに従つて先ず第1阻止帯が菌の或必須酵素系の阻害によつて生じこれには imidazole 誘導体が競争的に拮抗物質として働き，α-ケト酸は例えば transamination によつて活性の imidazole に変換できる場合に有効に作用するが，逆転生長帯はこれらの拮抗物質の蓄積を起すような非必須酵素系が閉塞されるためにあらわれ，更に第2阻止帯では上記の拮抗物質には影響されない今一つの必須酵素系の阻害が起るのであろうと解釈した。(中村広明)

Dimethyldithiocarbamate の殺菌機構 (2)

Sijpesteyn, A.K. and G.J.M. Van der Kerk: Investigations on organic fungicides. X. Pyruvic acid accumulation and its relation to the Phenomenon of inversion growth as effected by sodium dimethyldithiocarbamate. Biochim. Biophys. Acta, 919: 280～288. (1956).

前報 (IX) で *Penicillium italicum*(Pi) と特に *Aspergillus niger* (An) の胞子を種々の濃度の NaDDC を含む合成培地に加えた場合に起る特殊な生長反応 (逆転生長帯の出現) の原因は殺菌剤自体の菌の代謝に及ぼす作用によつて拮抗物質が蓄積されるためであろうと推定した。そこで両菌の菌糸塊を液体培地で振盪培養しその沪液中の α-ケト酸をペーパークロマトグラフイーで調べたところ Pyruvic acid (PA) のみが検出されたので分光光学的定量測定を行つた結果 PA の蓄積は NaDDC の濃度と関係があり，寒天上の生育試験で丁度逆転生長の起る濃度で最高値を示した。但し Pi では NaDDC の濃度が An の場合よりも低いところで PA の蓄積と逆転生長が起つた。又この蓄積には培地中に NH_4 イオンを必要とすることが明らかになつた。更に An の胞子による PA の蓄積を検討すると実験開始6時間後 (未発芽) に既に菌糸塊の場合と同じく NaDDC の濃度が 20 ppm のときに PA 蓄積のピークを示したが量はずつと少かつた。以上の事実を基に逆転生長に関する Goksφyr の金属とのキレーションによる純物理化学的説明 (本誌 21: 73 参照) に反証を挙げて PA の蓄積を誘導するような非必須酸素系の阻害を主張し類縁化合物 "antabuse" (=TETD) の還元型も PA の蓄積を起すことや亜ひ酸カリによる阻害が NH_4 イオンで促進されることからこれは PA 酸化酵素である可能性が多分にあり，これにもし動物の組織や或種の細菌と同じ助酵素が菌にも働くものならば α-lipoic acid か CoA の阻害も考えられると推量を深めた。(中村広明)

イネゴマハレ病に於ける病斑の大きさの分布と抵抗性（続報）*

黒　崎　良　男**

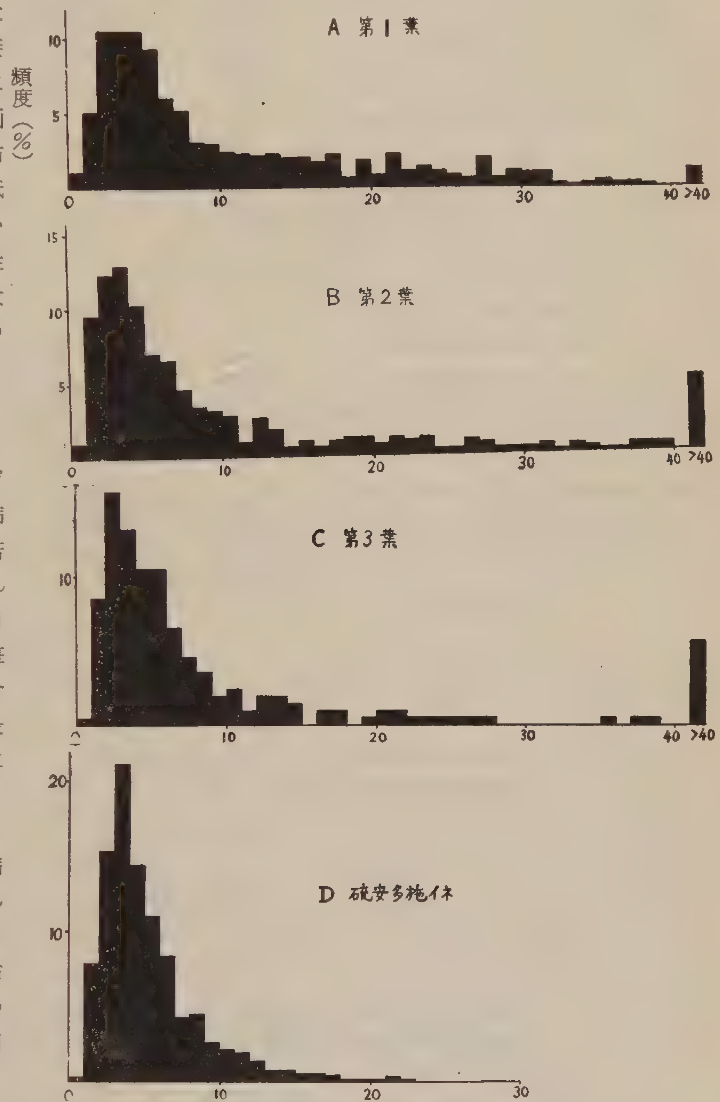
Yoshio KUROSAKI: Über die Beziehung zwischen der Fleckengrößeverteilung und der Widerstandsfähigkeit von Reispflanzen bei der Helminthosporiose (*Fortsetzung*).

前報[1]でイネゴマハガレ病病斑の大きさの分布が寄主組織の抵抗性と密接な関係にあることをのべたが，同時にその関係を基礎として理論的な分布函数を導入しておいた。そしてこの分布函数中の 2，3 の係数が寄主組織の抵抗性を記述する指数となることについて試論を提出した。本報では，抵抗性を異にする寄主組織について分布函数を決定した場合，これらの指数がどの様に変化してゆくかを論じてみたい。

1. 抵抗性を異にした場合の分布図註1

（1） 葉位を異にした場合 ゴマハガレ病では一般に古い葉ほど大病斑が目立つて多くなつている。即ち若い葉ほど抵抗性が大であると考えられる。第1図A，B，Cは，水稲品種朝日を用いて接種試験を行い，生じた病斑を葉位別に測定して作つた病斑長の分布図である。接種時の展開葉でその最上位のものを第1葉として，以下順に第 2，第 3 葉とした。

（2） 硫安過多で育てたイネ 窒素過多の状態のイネはゴマハガレ病に対して抵抗性を示すことが観察されている。筆者の接種試験でもこのことがみられた。その場合の病斑長の分布図を作つてみると第1図Dの様になつた。この場合品種は同じく朝日を用い，葉位を区別しなかつた。



第1図　病斑長の分布図　病斑長（単位 $^1/_{37}$ mm）

以上 4 つの分布図について，平均値その他 2，3 の統計量を第1表にまとめた。

第1表で奇異に感じることは，一見して大病斑の多い第3葉の平均病斑長が却つて小いということである。こういう例は他にも決して少くないと考えられる。これは第1図でAとCとを比較すれば理解出来るところである。即ち第3葉では大病斑も多いかわりに小病斑が多く，その中間が少いために平均値としては大差ないことになる。したがつて，ここでも寄主組織の拡大抵抗性を平均病斑長の様な単一の統計量で示すことの無理がうかがえる。

註 1　前報と全く同一材料でデータも一部重複する

* 京都大学農学部植物病理学研究室業績第 100 号

** 京都大学農学部

第1表　第1図に示された各分布の平均値及び標準偏差

栽培法	標準肥料			硫安多用
葉位	1	2	3	1～3
測定病斑数	623	507	197	1001
平均病斑長 (mm)	0.30	0.31	0.28	0.15
標準偏差	0.38	0.45	0.36	0.10

2.　抵抗性の時間的推移

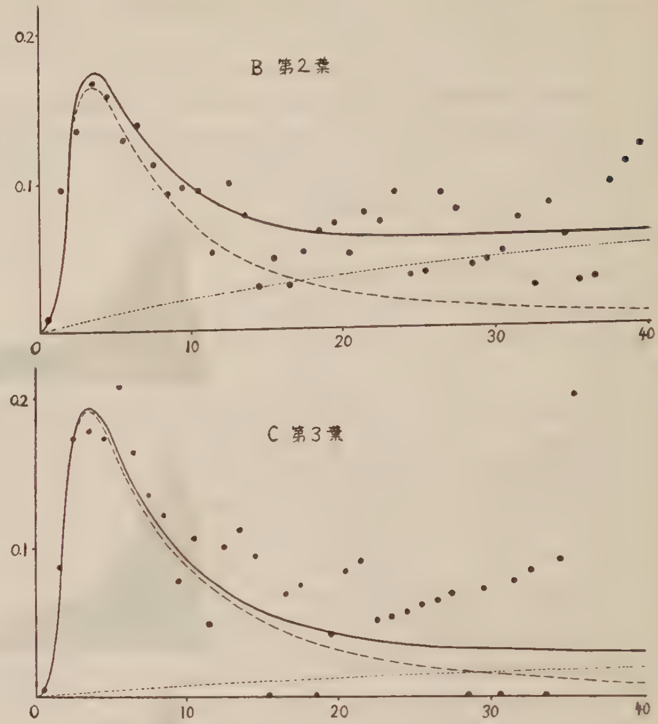
上にかかげた病斑長の分布図から，寄主組織の抵抗性が菌を接種してから時間と共にどういうふうに変化してゆくかを推察できることは前報で詳しくのべておいた。その計算法(前報第2表)に従つて以上4つの分布から抵抗性の時間的推移を算出して図示したのが第2図である。

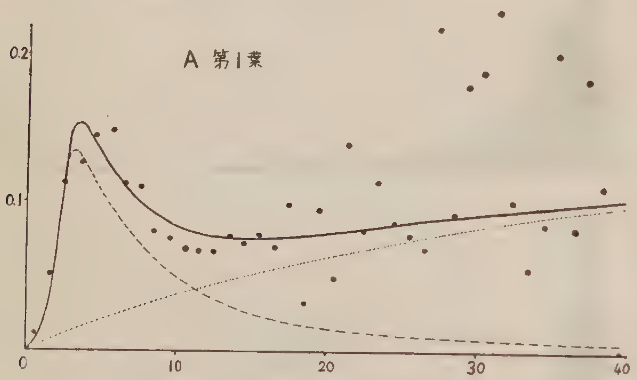
さて図中の実測点は次の様な指数函数で近似することが出来る。

$$f(t)=abt^{-2}e^{-\frac{b}{t}}+c\,(1-e^{-pt})$$

式中の4つの係数が各寄主によつてちがうのは勿論である。筆者が採用した一例を示せば第2表の様になる。

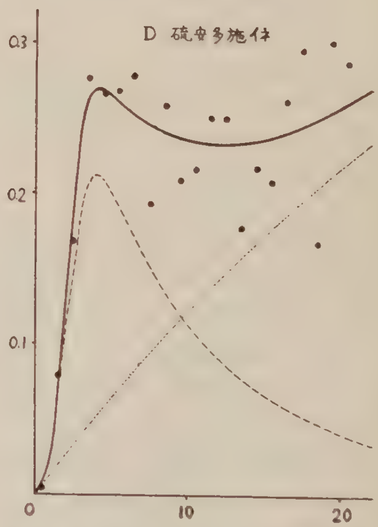
第2表は各寄主組織の抵抗性を比較検討する上に好材料をもたらすものであるが，その論議の前にここに採用した各係数値が当を得たものであるかどうかを吟味しておく必要がある。





菌侵入後の時間（単位約3時間）

第2図　抵抗性の時間的推移
•—•　実測点（前報第2表の計算法による）
——　時間的変動を近似した函数 $f(t)$
- - -, ……　同函数を構成する2つの函数 $f_1(t)$ 及び $f_2(t)$，但し，$f_1(t)+f_2(t)=f(t)$



第2表　抵抗性の時間的変動を近似する函数 $f(t)$ 中の各係数の値

寄主 ＼ 係数	a	b	c	p
標準肥　第1葉	1.50	6.4	0.17	0.03
〃　第2葉	2.13	7.0	0.08	0.03
〃　第3葉	2.46	7.0	0.03	0.03
硫安多用第1～3葉	3.40	8.0	0.50	0.03

3. 近似函数の適合性検定

第2図に与えられている実測点と近似函数の適合性の度合をそのままで統計的に検定することはできない。何故ならば図は抵抗性と時間の関係を表わすグラフであつて，現在の統計学では分布函数しか検定出来ないからである。この場合はもとの分布函数即ち第1図にもどして検定することが出来る。即ち抵抗性の時間的変動を表わす函数 $f(t)$ が既知ならば病斑長の分布の確率密度 $\varphi(x)$ は

$\varphi(x)=f(x)e^{[F(0)-F(x)]}$ で与えられる[1]。ここに $F(x)=\int f(x)dx$ である。実際の計算には

$\int_0^x \varphi(x)dx=e^{F(0)}[-e^{-y}]_{F(0)}^{F(x)}$ を用いればよい。

こうして計算した分布を第1図と較べることによつて適合度検定が出来る。4つの分布を逐一表示して比較することは煩雑であるので χ^2 だけ第3表にのせた。

第3表　分布函数の適合度検定のために計算された χ^2

寄主組織	χ^2	自由度	棄却危険率
標準肥 第1葉	21.4	16	0.10
〃 第2葉	23.8	16	0.10
〃 第3葉	6.6	11	0.75
硫安多用 第1～3葉	17.6	12	0.10

この結果，計算した病斑長の分布は棄却される根拠がないので，第2表に採用した各係数と，これらを含む抵抗性の函数は妥当なものと解して大過ないと考えられる。

4. 論　議

肉眼的観察によると，古い葉ほど大病斑が目立つところから，ゴマハガレ病菌に対しては若い葉ほど抵抗性である様に考えられてきたが，その内容は案外複雑で簡単に割り切ることは出来ない様に思われる。既にのべた様に，病斑長の平均値を以つて拡大抵抗性を定量化することには疑義がある。即ち平均値なるものはあくまでも単なる統計量の域を出ないものであつて，これを基として内部に如何なる抵抗反応が起つているかということを追求するには自ら限界があるものと考えられる。例えば第1葉と第3葉とを較べてみると，病斑平均長では大差がない。しかし筆者の解析によつて，事情を今少し動的にみると，第1葉では初期抵抗反応の強さを表わす係数 a の値が小さく，後期反応の高まりを表わす係数 c の値が比較的大きくなつている。ところが第3葉では a は比較的大きいが c が小さく後期反応は殆んど現われていない。したがつてこれらの寄主組織を化学分析その他に供する場合，どちらの反応を対象にしているかを充分認識してかかる必要がある。両反応は量的変動のみならず，質的にも全く異つたものが起つているかもしれないから，この認識を誤るならば実験結果を解釈する上に重大な過ちを犯す恐れが生ずる。また初期反応の早さを表わす係数 b の値には各寄主とも大差はないが，この反応の曲線がシャープであるために僅かな時間的ずれで，差のあるものでも見つからずに終つてしまうことも当然考えられる。後期反応の早さを表わす係数 p の値は各寄主とも殆んど差がないので，ここでは前もつて 0.0_3 に統一して計算した。この値は固定しても差支えない様に思われる。

5. 要　約

1. 前報で導入した病斑長の分布函数を抵抗性の異る他の寄主に適用したところ，実測値と計算値は比較的よく一致した。

2. 拡大抵抗性を記述するには，平均病斑長の様な統計量では不充分であり，今少し動的にみる必要がある。葉位別にみた抵抗性を例にとりこの点を論じた。

(1957 年 10 月 23 日 受理)

文　献

(1) 黒崎良男： 日植病報，22：251～256. (1957)，
(2) 林 桂一： 高等函数表 (1942) 東京

Zusammenfassung

1. Die Flekenlängeverteilung der Helminthosporiose von Reispflanzen wurde mit 4 Arten des Wirtsgewebes beobachtet, die sich im Bezug auf die Widerstandsfähigkeit unterschieden.

2. Jeder beobachteten Verteilung gab der Autor die theoretische Verteilungsfunktion, die in seiner letzten Arbeit eingeführt worden hatte.

3. Die Verteilungsfunktion gilt jeder ursprünglichen Fleckenlängeverteilung wohl.

4. Aus der Fleckenlängeverteilung kann man die Beziehung zwischen der Ausbreitungsresitenz des Wirtsgewebes und der Zeit nach Invasion des Erregers durch eine einfache Rechnung ziehen.

5. Auf den Grund des so gerechneten Resistenzablaufs diskussierte der Autor von dem Unterschied der 4 artigen Wirtsgewebe und der Beschreibungsmethode für Ausbreitungsresistenz. (Institut für Phytopathologie, Universität zu Kyoto)

植物ウイルス病の化学療法に関する研究

II. 葉面散布法による未知抗生物質の第2次スクリーニング

下村徹・西川陽之助・平井篤造*

Toru SHIMOMURA, Yonosuke NISHIKAWA and Tokuzo HIRAI: Studies on the chemotherapy for plant virus diseases. II. Screening tests of the new antibiotics by leaf-spraying method.

さきにわれわれは未知抗生物質約 70 種について浸漬法による第1次スクリーニングを完了し，その結果，われわれの実験条件下では，かなりタバコモザイクウイルス (TMV) の増殖を阻止するもの20数種を見出した。このスクリーニングは，薬剤が効き得る最良の条件で行われているから，より実用化に近づく為には，更に第2次第3次と，その線にそつてスクリーニングを進めなければならない。

今回は第1次スクリーニングで選出した約20種の抗生物質について，これを TMV感染の切取葉葉面に散布したところ，多少とも有望なものを2.3見出したので，その結果について報告する。

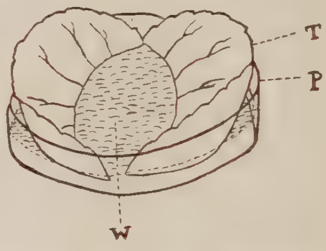
1. 実験材料および方法

供試抗生物質は何れも武田薬品工業研究所で分離された粗物質である**。浸漬法の場合は，薬害の生じない範囲の高濃度，主として 50～500ppm. で供試したが，散布法では浸漬法に比べて薬害が出にくいので濃度をより高め，250～1000ppm. で供試した。抗生物質は水溶性のものは水に，難溶性のものは acetone 又は methanol に溶解し，水を加えてエマルジョンとして，それぞれ pH 6.0 に調整して使用した。

用いたウイルスは秦野タバコ試験場から分譲された TMV の ordinary strain で，用いたタバコはトルコタバコである。

今までの経験によると，同一条件で育成したタバコ苗に TMV を接種した場合，苗によつて TMV の増殖量にかなりの差がみられることがあり，同一苗でも葉位によつてやはり差がみられる。また今回の実験では薬量が少い為，多数のタバコ個体を供試することは不可能であつた。以上の理由から止むを得ず，接種した切取葉の半葉に薬液を散布し，他の半葉は対照として，両者の間でその効果を判定することとした。

すなわち，葉数 7～8 枚のタバコの大いさの比較的均一な中間葉から2枚の葉をとり，裏面に TMV を接種して，これを中肋から2分し，それぞれの半葉2枚を合せてこれに抗生物質の所定濃度液 (Rapisol C を 1/1500 添加) を散布する。一方他の半葉2枚は薬液無散布の対照とする。これらの半葉は第1図に示す様に切口を下にしてその部だけをペトリ皿の水に浸漬する。薬液を散布する場合，水に浸漬された部分にはかからない様に注意し，散布後葉面の薬液が乾燥してから水に浸漬した。その間，対照区は薬液を与えない他はすべて同一の条件に保つた。各ペトリ皿は 25°C の硝子張恒温器に納め，螢光燈で連続照射した。薬液の散布は TMV 接種5時間後，その後2日目，4日目の計3回行つた。



第1図　葉面散布法における試験植物の管理

Figure 1. A diagram showing the method of maintaining the test plant. The detached tobacco leaf-halves which have been inoculated with TMV are dipped into water at the cutting edges. The antibiotic solution was applied on leaves by spraying three times at intervals of 5 hours, 2 days and 4 days after inoculation.
T: tobacco leaf-halves P: Petri dish W: water

かくて接種後6日目に葉をとり出しよく洗滌し，増殖した葉中のウイルスを分離定量した。

ウイルスの分離定量: 前報では，タバコの葉を生重の3倍量の水を加えて磨砕し，磨砕液を60°C・10分間加熱して易熱性物質を遠沈し去り，上澄についてウイルスを分析した。すなわち，硫安による塩析と水抽出を反覆して，緑色のなくなつた後に dil. HCl で pH を等電点としてウイルスを沈澱させ，これを Folin 試薬で発色させ，光電管比色計で定量した。

---

* 名古屋大学農学部植物病理学教室

** 同試料を供与された立岡研究部長の御厚志に感謝する。

その後，この方法に漸次改良を加え，今回は次の様な方法によつた。W. N. Takahashi[2]によると組織を緩衝液で抽出することにより，水抽出の場合に比べてウイルス収量が著しく増加するという。そこで McIlvaine, Lillie の緩衝液（pH7.0）で葉を磨砕し，易熱性物質を除いた上澄について硫安塩析と緩衝液による抽出を反復した。これだけではまだ色素がぬけにくい場合があるので，B. Commoner ら[3]にならつて pH を 5.0 に下げてここで不溶性の物質を遠沈除去した。最後に得た透明な汁液にクエン酸を加えて pH を等電点に下げ，ウイルス蛋白を沈澱させ，これを前報に準じて定量した。ウイルス分離の手順を第2図に示した。

Leaf
| homogenized with buffer (pH7.0)
Leaf homogenate
| heated at 60°C for 10 min. and centrifuged at 36.000 rpm.
Supernatant
| added $(NH_4)_2SO_4$ to 1/4 saturation and centrifuged at 6.000 rpm.
Sediment
| extracted by buffer (pH 7.0) and centrifuged at 8.000 rpm.
Supernatant
| added $(NH_4)_2SO_4$ to 1/4 saturation and centrifuged at 6.000 rpm.
Sediment
| extracted by buffer (pH 5.0) and centrifuged at 8.000 rpm.
Supernatant
| brought to pH 3.4 with citric acid and centrifuged at 8.000 rpm.
Virus Pellet

第2図 罹病葉からのタバコモザイクウイルスの分離法

Figure 2. Scheme for separation of TMV from the infected leaf. (Improved procedure)

Local lesion 数の測定：緩衝液で磨砕した汁液の一部についてウイルスの化学定量を行うと共に，他の一部をインゲン（品種・大手亡）の葉に接種して，一定時間後発現する local lesion 数を測定した。すなわち，各薬剤処理毎に，インゲンの初生葉の一葉に薬液散布葉汁液を，他の一葉に対照葉の汁液を接種して，薬液散布によるウイルスの生物的活性への影響を検定した。

2. 実験結果

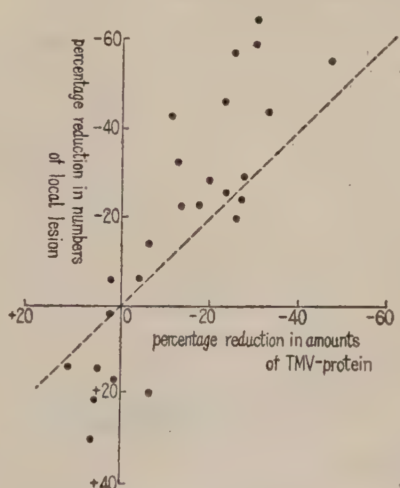
(1) 試験方法の検討

化学定量法でどの程度ウイルスが回収されるものか問題になるが，F.C. Bawden and N. W. Pirie[4], W.N. Takahashi[2] によると磨砕残渣に多量のウイルスが含まれ，その大部は酵素処理によつて初めて分離されるという。故に最初の磨砕汁液を遠沈することにより残渣に含まれる多量のウイルスが回収されずに残る可能性がある。

本実験中にウイルスの各抽出段階における抽出後の沈澱を全部集めて，これから反復してウイルス抽出を試みたところ，尚5％前後のウイルスが得られた。又前述の方法によつて精製分離したウイルスを溶解し，pH 3.0, 3.4, 4.2, 4.6, 5.0 の各 pH での沈澱量を調べた所，pH 3.4 の場合を 100％ とすると，それぞれ 94, 100, 24, 17, 16％ となり，定量途上 pH5.0 で不溶性物質を遠沈しさることにより，かなりのウイルスが失われることが想像される。従つて回収率はあまり高いとは思われない。ウイルスを接種して同一条件で浮遊培養した4区のタバコの葉について第2図の方法でウイルスを定量し，3回反復した結果では標準偏差はそれぞれ ±3.0, ±6.9, ±4.6％ であつた。

最近 J.B. Bancroft and Roy. W. Curtis[5] により核酸定量によるTMVの定量方法が発表されているので，現在はその変法により各種薬剤の効果について検討中であるが，この方法は更に簡単で手数と時間を要しないし，又比較的正確である。

次に TMV の化学定量の結果とインゲン葉上の local lesion 数から判定した TMV の生物的活性の関係について検討を加えてみた。E. L. Spencer[6] によると，寄主の栄養



第3図 抗生物質を葉面散布した場合の，TMV の化学定量法と local lesion 法によるその生物的活性との比較

Figure 3. Comparison of the chemical analysis of TMV protein in the leaves sprayed with antibiotics, with its biological activities expressed by the local lesion method.

条件により TMV の蛋白量と生物的活性は必ずしも平行しないことが述べられているし，また R.E.F. Matthews[7] によると，8 azaguanin で TMV 増殖を阻害した場合，減少したウイルス粒子のなお半分が活性を失つていることを報告している。われわれもこれらの関係について知る為，種々の薬液で処理した場合の TMV 蛋白量の減少率とインゲン葉上の local lesion 数の減少率の相関を，今迄得られたデーターについて調べてみた。第3図に示す様に，両者は比較的平行した関係にあつたが，TMV 蛋白量がかなり減少する条件では，local lesion 数の減少率がより著しく，蛋白量の減少が少い場合には local lesion 数の減少率はより低く，やや増加を示すこともあつた。

(2) 第2次スクリーニングの結果

第1次スクリーニングで合格した24標品の内，18標品を選んで検定を行つた。なおこれに加えて，TMV の増殖阻害に卓効を示すといわれる Merck の noformicin[8] の他，aureothricin の検定も行い，それ等の結果を第1表に示した。

第1表には比較の為第1次スクリーニングの浸漬法における結果を併せて記載した。この表をみると，散布法の場合には，薬液の濃度をかなり高めたのにもかかわらず効果はかなり落ちることが分る。20%以上の阻害率を示したものは18標品の内2.3である。これらの抗生物質の一部のものについて化学定量と同時にインゲン葉上の local lesion 数から効果を判断すると，化学定量で 10～20% の阻害を示した場合には local lesion 数では何れも 40% 以上の阻害率を示した。反対に化学定量で阻害率10%以下のものはlesion数ではかえつて増加を示す場合が多い。この傾向は前述した通りである。以上の結果から鉢植の植物に薬液を散布してその効果を期待し得る迄にはまだまだ色々と検討を重ねる必要が感じられる。次

第1表　未知抗生物質の抗ウイルス性作用

Table 1. Antiviral activity of the new antibiotics. The data obtained by leaf-spraying method are presented with those obtained by leaf-floating method including previous report[1].

Percentages of inhibition to virus multiplication	Floating method	Spraying method	
	chemical analysis	chemical analysis	local lesion assay
40～	13(500), 21(50)* 22(50), 26(100) 29(500), 50(200) 62(250), 65(250)		20(1000), 21(1000) 25(1000), 43(1000) 44(1000), 65(1000)
30～40	noformicin (<200) 25(50), 27(500) 39(250), 43(200) 44(100), 55(250)	20(1000)	
20～30	aureothricin(25) 10(1000), 20(500) 28(500)	aureothricin(250) 25(1000) 26(1000)	26(1000)
10～20		21(1000), 39(1000) 43(1000), 44(1000) 65(1000)	
～10		noformicin (<1000) 10(1000), 13(1000) 22(1000), 27(1000) 28(1000), 29(1000) 50(1000), 55(1000) 60(500), 62(1000)	22(1000), 28(1000) 39(1000), 55(1000) 62(1000)

* Figures show preparation numbers of antibiotics, and those in parentheses show the concentration tested in ppm.

第2表　トマト苗の葉面散布法による未知抗生物質の抗ウイルス性作用

Table 2. Symptom exhibition and TMV multiplication, as determined by chemical analysis of virus protein, in the potted tomato seedlings, sprayed with solution of several new antibiotics.

Percentages of inhibition to virus multiplication	Antibiotics Nos.	Inhibition on symptom exhibition	Antibiotics Nos.
30～	21 (500)* 44 (500)	slightly effective	21(500) noformicin(<100)
20～30	26 (<250)	no visible effect	20 (500) 26 (<250) 39 (500) 44 (500) 65 (450)
～10	noformicin(<100) 20 (500) 39 (500) 65 (450)		

* Noted in table 1.

にウイルス蛋白が20～40%阻害され，local lesion 数から判断した生物的活性が40%近く阻害された条件では，ウイルスの病徴発現に如何なる影響が及ぶかを知ることは興味ある点だと思われたので，次の実験を行つた。

草丈約 9 cm の鉢植トマトに前述の葉面散布で効果を示した薬剤を中心に，その所定濃度液（Rapisol C を 1/1500 含む）を葉面に散布，2 日後TMVを接種し，接種 1 日後迄は毎日，その後は 1 日おきに散布した。接種 2 週間後，タバコの場合に準じて TMV を分析した結果を第 2 表に示す。

上記によると病徴には余り影響なく，No. 21 がやや病徴進展の抑制を示した。noformicin はウイルス蛋白量の減少を殆んど示さなかつたが，病徴進展は無散布のものに比してかなり抑制を示した点が目立つ。反覆した実験で，何れも No. 21，No. 44 がウイルス阻害にやや効果を示したのが注目された。

3. 論　　議

第 1 次スクリーニングの浸漬法では，相当数の抗生物質がかなりの効果を示したが，葉面撒布法では，ウイルス増殖を 20～30% 阻害し得るものは少数である。しかもこれは薬害の生じない範囲の高濃度で回を重ねて散布して得た結果である。Merck の noformicin は，TMV 阻害に卓絶した効果を示すことが報告されているが，われわれの実験条件下では，浸漬法，散布法何れにおいても期待した程の効果がみられなかつた。実験条件によつては，ここに扱つた未知抗生物質もより期待し得る効果を示すことも考えられるが，ともあれ実用化への道は未だ遠く，ウイルス感染機作の解明と相まつて，それ迄に解決すべき問題が余りにも多い。

これらの抗生物質は何れも粗物質であつて，その純度は必ずしも高いものばかりとはいえないし，又その安定度も明らかでないから，これらの点も考慮する必要があろう。R. A. Gray[9] によると streptomycin の吸収は glycerol の添加により著しく増大することが述べられ，又同じ R. A. Gray[8] によつて noformicin の散布時期と感染時期の関係がウイルス増殖に及ぼす影響について報告されているから，抗生物質の吸収を高める条件，散布の適期などについても検討を加えなければならない。

なお，ここに扱つたウイルスはTMVのみであるが，TMVは植物ウイルスの内でも最も安定なものであるから，もつと不安定な他のウイルスの場合には，上述の未知抗生物質がより効果を表わすのではないかとも思われる。何れ機会を得て他のウイルスについてもスクリーニングを行う予定である。

本研究の費用の一部は文部省科学研究費(各個研究)によつた。記して謝意を表する次第である。

4. 摘　　要

1) 浸漬法による第 1 次スクリーニングで選択した未知抗生物質の内，18標品について切取葉の葉面散布法による第 2 次スクリーニングを行つた。

2) 第 1 次スクリーニングでかなり効果を示した抗生物質も，葉面散布法では何れも効果が減少した。しかしなお20%程度の阻害率を示すものが多少得られた。これらの標品をTMV感染の鉢植トマトに散布して，ウイルス阻害にやや有望と思われるものが認められた。

3) 前報でとられたウイルスの分離方法を多少改良し，その方法について検討を加えた。

(1957年 9 月21日受理)

引 用 文 献

1) 平井篤造・下村徹・山口昭・松井千秋・西川陽之助：日植病報，22：70～74．(1957)．
2) Takahashi, W. N.: Phytopathology, 41: 903～907. (1951).
3) Commoner, B. et al.: Arch. Biochem., 27: 271～286. (1950).
4) Bawden, F. C. & Pirie, N.W.: Brit. Jour Exp. Path., 25: 68～80. (1944).
5) Bancroft, J. B. & Curtis, R.W.: Phytopathology, 47: 79～82. (1957).
6) Spencer, E. L.: Plant. physiol., 17: 210～222. (1942).
7) Matthews, R. E. F.: J. Gen. Microbiol., 10: 521～532. (1954).
8) Gray, R. A.: Phytopathology, 45: 281～285. (1955).
9) Gray, R.A.: ibid., 46: 105～111. (1956).

Summary

Recently the writers have presented the evidence that the new antibiotics separated by the laboratory of Takeda Pharmaceutical Industries, Ltd. inhibit by 20-58 per cent the TMV multiplication in detached tobacco leaf. These results have been obtained by leaf-dipping and -floating methods, presumably under the most favorable conditions. The subsequent investigations were designed to apply by leaf-spraying method the antibiotics which had

been proved to be relatively effective in the previous screening tests.

As test plant, detached tobacco leaf-halves were used. Selected leaves of uniform size were inoculated to the lower side with TMV, and cut into halves. One of the halves was sprayed with an antibiotic solution, and another half was left for check. These halves were maintained in a Petri dish, dipping the cut edge in water, as illustrated in figure 1. The assay of TMV produced in leaf tissues was carried out by the chemical analysis of the virus protein, the procedure of which is shown in figure 2, in parallel with the local lesion method using bean leaves. The measured account of virus protein in the leaf showed a moderate correlation with the number of local lesions produced on bean leaves (Figure 3).

From the results of the virus protein analysis, 3 new antibiotics out of 18 tested were found to exhibit 20 per cent or more inhibition to virus multiplication, while higher figures of inhibition was obtained by the local lesion assay (Table 1). This finding raises the serious problem whether the local lesion method represents a real value of virus activity. In order to see the effect of antibiotics upon symptom expression, potted tomato seedlings inoculated with TMV, were sprayed with antibiotics. As represented in table 2, almost no visible effect of the antibiotics upon symptom exhibition was noted, nevertheless yet 20 per cent or more virus inhibition was confirmed by the chemical analysis of the virus protein produced within the plant.

The authors' sincerely thanks are due to Dr. R. A. Gray, who kindly supplied noformicin to our laboratory.

Plant Pathology Laboratory
Faculty of Agriculture
Nagoya University
Anzyo, Japan

文　献　紹　介

Dimethyldithiocarbamate の殺菌機構 (3)

Sijpesteyn, A. K, M. J. Janssen, and G. J. M. Van der Kerk (1957) Investigations on organic fungicides.
XI. The role of metals and chelating agents in the fungitoxic action of sodium dimethyldithiocarbamate (NaDDC). Biochim. Biophys. Acta. 23: 550～557. (1957).

NaDDC の殺菌作用における金属の役割を今までの研究では考慮しなかつたがこれについてはさきに Goksφyr の報告（本誌21: 73）があり，又 dithiocarbamate やその拮抗物質である imidazole が何れも金属結合能をもつ化合物であることから *Aspergillus niger* (An) を用いて検討を加えた。液体培地に4日間培養した An の生長は NaDDC の濃度が 50 ppm 以上で阻害されたが，これに 10ppm の $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 又は 30 ppm の $CuSO_4 \cdot 7H_2O$ が加わると 0.5–5 ppm の NaDDC の存在によつても阻害が起つた。寒天培地（洗わない寒天とガラス器で作つた蒸溜水を使用）で同様の阻害を得るために要した硫酸銅は僅に 1 ppm に過ぎなかつた。寒天を井水でよく洗うと約 1 ppm の硫酸銅が含まれてしまうことが確認されたので従来特に Cu を加えないでも寒天上では第1阻止帯が出現した原因が明らかになつた。鉄，マンガン及び亜鉛の硫酸塩の添加は効果がなかつた。10 ppm の硫酸銅を加えた液体培養の沪液の紫外線吸収スペクトルは明らかに，Cu : DDC=1 : 1 complex の存在を示し，その最高値は丁度 NaDDC の濃度が第1阻止帯の範囲であつた。1 : 1 complex の形成状態は L-histidine や imidazole pyruvic acid を多量に加えても変らなかつたが拮抗現象はあらわれた。それ故この拮抗作用は 1 : 1 complex に対して菌の必須酵素と競争するために起るものと考えた。又逆転生長帯の部分では不溶性で無毒の 1 : 2 complex が形成され，以上は Goksφyr の結果と一致した。pyruvic acid の蓄積は金属がなくても起り NaDDC が 10 ppm 以上の場合に漸増するが 10 ppm の硫酸銅が加わると第1阻止帯でも僅かに起つた。結局逆転生長帯には毒性物質は存在しないのでこの帯の出現は pyruvic acid の蓄積によるとした従来の見解は訂正しなければならないが，金属が結合し尽すと遊離の DDC が残りこれが菌の代謝に作用して第2阻止帯を作るものと考えられる。（中村広明）

稲小粒菌核病の被害度と各種水稲病害との関係

II. 穂首イモチ，節イモチ及び紋枯病との関係

野　中　福　次*

Fukuji NONAKA: Relation between the severity of rice stem rot caused by *Leptosphaeria salvinii* Cat. and some other paddy rice diseases.

II. On the influences of neck and node blast (*Piricularia oryzae* Cav.) and sheath spot (*Corticium sasakii* (Shir.) Matsum.) to rice stem rot disease severity.

I. 緒　　言

著者は稲の葉身を出穂前後に剪除すれば，稲小粒菌核病の被害度が非常に増大することを認めた[5)]。これは稲葉の剪除により稲は正常な生育を妨げられ，茎は極端な C/N 率の低下を来し，早期老化するためと考えた[4,6,7)]。水田における水稲栽培では単一病害に侵される以外に各種病害が併発することはしばしば経験するところである。稲の小粒菌核病の場合も同様で，著者は穂首イモチに侵された水稲は小粒菌核病の被害度が非常に少いことを認め，この裏付けとして穂首切断を行い，本病の被害度が非常に軽減されることを報告した。西沢は稲線虫心枯病に侵された水稲でも同様小粒菌核病の被害度が減少することを報告している[2)]。

本報告は，先に行つたイモチとの関係を更に追究する意味で穂首イモチ，節イモチ，及び紋枯病と稲小粒菌核病の被害度について行つた実験である。この実験を行うに当り種々御教示賜つた吉井教授，木場助教授並に実験調査を援助された岩田唯孝氏に深謝の意を表する。

II. イモチ病と稲小粒菌核病との関係

穂首イモチに罹つた水稲は，小粒菌核病の被害度が少い傾向を示すことを明らかにしたが[3)]，同じ穂首イモチでも，穂の一部が侵されたり，成熟がある程度進んだ後に侵された水稲と，出穂期又はその直後に侵された水稲では，その生理に及ぼす影響も異るものと思われ，また一方節イモチに侵された場合も，穂首イモチとは異つた影響を及ぼすと考えられるので，これらのイモチ病と小粒菌核病との関係を調査した。

(1) 実験方法

i. 耕種法：$^1/_{300}$ 反コンクリート槽を用い，7 月 12 日に播種した水稲旭を 7 月 30 日移植，1 槽当り 90 株，1 株 3 本植とした。施肥量は硫安210gr，過石 60 gr，硫酸加里 40 gr を 1 槽当り基肥として散布。

ii. 稲小粒菌核病菌の接種源：前年度，本圃場で菌核接種を行いその残存菌核を接種源とした。

* 九州大学農学部

iii. イモチ病菌の接種源：(i) の耕種法で示した如く，晩播，晩植，多肥による自然接種によつた。なお穂首の病斑がイモチ病菌によるものであることを病原菌の再分離により確めた。

iv 調査方法　穂首イモチ病の被害度：被害度を軽症，重症の二種に分けて調査した。この場合節イモチに全く侵されていないもののみをとつた。

軽　症：出穂後籾がかなり充実した後発病が認められたものか，穂全体の $^1/_2$ 以下の小穂が侵されているもの。

重　症：出穂時又は出穂初期に侵されたもので，籾の充実が全く認められないもの。

節イモチ病：節部が侵され，収穫時にはそれより上の部分が枯死しているもの。この場合，上から第一節（止葉の節）及び第 2 節が侵されているものが大部分であつた。穂首イモチの併発茎は除去した。

稲小粒菌核病の被害度：穂首イモチ，節イモチ及び対照区（イモチ無被害）水稲について，それぞれ菌核病の被害度を九大法[10)] によつて調査した。調査は 11 月 1 日刈り取つて行つた。

第 1 表　穂首イモチ，節イモチと稲小粒菌核病被害度

反覆 / イモチ	1	2	3	4	計
イモチ無被害水稲区	27.3	30.9	36.4	30.7	125.3
穂首イモチ軽症区	31.4	34.0	19.0	15.5	99.9
同　重　症　区	10.2	9.6	10.5	5.7	36.0
節　イ　モ　チ　区	53.8	57.0	61.3	130.0	302.1

イモチ処理** $|D| \geqq 130.2$

被害度：節イモチ＞イモチ無被害水稲区，穂首イモチ軽症区，同重症区

(2) 結果及び考察

第 1 表に見られる如く，節イモチに侵された水稲区が最も小粒菌核病の被害度は大きく，他の区に対して極めて高い有意差が見られた。収穫時，その茎基部には多数の菌核が形成されているのを認めた。これに対して，イモチ無被害区と，穂首イモチ罹病区間には有意差は見られなかつたが，この中でも穂首イモチ軽症区

と，イモチ無被害区にはあまり差は見られなかつたのに対して，穂首イモチ重症区では全区中最も小粒菌核病の被害度は少く，他区水稲に比べて，収穫期においてもその茎基部は緑色に富み，粗剛で活力に富んでいた。

以上のことから，節イモチと穂首イモチとが，稲小粒菌核病に及ぼす影響は逆の作用があり，節イモチは小粒菌核病の被害度を非常に助長するのに対して穂首イモチは小粒菌核病の被害度を軽減せしめる傾向がある。節イモチに侵された水稲は罹病部より上位の部位は枯死し，同化作用を始め，水稲の生活機能の低下を来し，小粒菌核病の進展を早めるものと思われる。一方穂首イモチの場合，特に早期にイモチに侵された水稲では，穂首切断に見られる如く，穂部へ行くべき養分が茎葉部に貯蔵されてその老化がおくれ，小粒菌核病菌の進展を抑えるものと考えられ，前報告[3]に見られる通りである。このことは穂首イモチ軽症水稲ではイモチ無被害水稲と，あまり小粒菌核病の被害度に差異がないことからも推察出来る。

III.　稲紋枯病と稲小粒菌核病との関係

稲紋枯病は小粒菌核病と同様に最初水際の葉鞘部を侵し，漸次上位葉鞘に病斑を形成，進展し，侵された葉鞘は下葉から早期に枯死，脱落する。小粒菌核病も同様に下部葉鞘を侵害するものであるが，上部葉鞘への進展はみられず，その反面，水際葉鞘より，茎の内部に侵入した後稈を侵すものである。このように紋枯病と小粒菌核病は発病後の菌の生態が異り水稲生理に及ぼす影響も異ると考えられる。ここでは，水稲が紋枯病に侵害された場合，小粒菌核病の被害度に如何なる影響を及ぼすかを試験した。

実　験　1（昭和 30，31 年度試験）

(1)　実験方法

i. 試験区：$^1/_{1800}$ 反四角コンクリート槽を用い，これに5月 28 日播種した水稲品種旭（30年度），農林 37 号（31年度）を，7月2日及び6月 27 日にそれぞれ移植，1槽当り 12 株，1株3本植とし，施肥量は硫安 40gr，過石 20gr，硫酸加里 10gr を基肥として移植前に施用。

ii. 稲小粒菌核病菌の接種：稲ワラに培養した稲小粒菌核病菌の菌核を1槽当り0.5 gr，7月28日及び8月 22 日に浮游接種。

iii. 紋枯病菌の接種：稲ワラに培養した稲紋枯病菌の菌核を8月 18 日及び8月 22 日にワラのまま株間に挟み込み接種。

iv 紋枯病被害度の調査：31 年度試験において9月 30 日に紋枯病の被害度を吉村氏の算定法[9]に基き調査した。

v 小粒菌核病被害度の調査：11 月1日に刈り取り九大法[8]により被害度の調査を行つた。

(2)　結　果

紋枯病を接種した水稲では，昭和 30，31 年度の何れも，接種後4～5日目に水際葉鞘部に病斑の形成を認め，その後漸次上方に病斑が伝播していくのもあつたが，全般的にその後の進展はあまり認められず，第4表の如く，両年度共に被害度は 10 %内外であつた。

稲小粒菌核病の被害度は第2表，第3表に見られる如く，両区の間に有意差は認められない。即ち紋枯病の被害度が 10% 位であれば，小粒菌核病の被害度に影響を及ぼさない。

実　験　2（昭和 32 年度試験）

(1)　実験方法

i. 試験区：実験1と同様 $^1/_{1800}$ 反コンクリート槽を用い，水稲品種金南風を移植栽培した。

ii. 稲小粒菌核病菌の接種：実験1と同様，8月2日菌核を 0.5 gr浮游接種した。

第2表　紋枯病と稲小粒菌核病被害度（昭 30 年度）

処理＼反覆	1	2	3	4	5	6	計
小粒接種区	65.2	72.7	75.7	75.2	60.0	104.5	453.3
小粒・紋枯接種区	77.8	65.6	83.5	67.6	68.1	67.8	430.4

第3表　紋枯病と稲小粒菌核病被害度（昭 31 年度）

処理＼反覆	1	2	3	4	5	計
小粒接種区	8.1	4.3	12.1	9.2	9.0	42.7
小粒・紋枯接種区	10.8	6.8	9.3	19.7	16.3	62.9

$|D| \geqq 31.5$

第4表　紋枯病被害度％（吉村氏法による）

処理＼反覆	1	2	3	4	5	平均
紋枯病被害度	8.3	7.4	8.4	12.3	9.3	9.14

iii. 稲紋枯病菌の接種：稲ワラ培養の紋枯病菌の菌核を8月 27 日及び9月2日に葉鞘内に挟み込み，40 時間ビニールにて覆つた。尚次の2項目に分けて接種を行つた。　接種区(1)：次葉鞘（止葉の次の葉鞘）まで菌核を接種，　接種区(2)：3葉鞘（止葉から3枚目の葉鞘）まで菌核を接種。

iv 被害度の調査：紋枯病の被害度は9月2日小粒菌核病の被害度は11月4日，実験1と同様行つた。

(2)　結　果

紋枯病の被害度は第5表の如く，接種部位の葉鞘は

第5表　紋枯病被害度（%）（昭 32 年度）

処理 ＼ 反覆	1	2	3	4	5	6	7	計	平均
紋枯病接種区 (1)	58.3	55.5	33.3	48.3	42.2	39.6	56.0	333.3	47.6
紋枯病接種区 (2)	13.8	25.0	33.3	27.2	27.5	33.3	20.9	181.0	25.8

第6表　紋枯病と稲小粒菌核病被害度（昭 32 年度）

処理 ＼ 反覆	1	2	3	4	5	6	7	計
紋枯接種区 (1)	37.5	26.8	24.7	14.0	16.9	15.2	15.7	150.8
紋枯接種区 (2)	8.3	20.0	6.6	10.0	21.7	10.0	24.8	101.4
対照区	6.9	5.0	9.0	5.7	4.3	11.7	16.3	58.9

紋枯病処理*　　|D|≧66.7　　被害度：紋枯病接種区 (1)＞対照区

ほとんど発病し，特に次葉鞘迄の接種区では葉鞘，葉身の枯死がみられ，47.6 %の被害度を示した。又 3 葉鞘接種区も，25.8 %の被害度を示し，実験 1 の被害度より大であつた。稲小粒菌核病の被害度は第 6 表の通りで，紋枯病接種区(1)の次葉鞘接種区が最もひどくこれに対して対照区（紋枯病菌無接種区）は被害が軽少であり，両区間に有意差が認められた。尚，3 葉鞘接種区と対照区間には有意差はみられなかつたが，対照区に比べて小粒菌核病の被害度が少い傾向を示した。

(3) 考　察

実験 1（昭和 30，31 年度）に於いては紋枯病菌の接種を水際の株間に挟み込んで行つたためか，その被害度が10 %内外で軽少であつた。従つて次葉鞘又は 3葉鞘に病斑を形成していることはまれであり，水稲自体もあまり紋枯病の影響をうけていないと想像される。このため，稲小粒菌核病の被害度も対照区と差異はなく紋枯病を接種したために稲小粒菌核病の被害が増大するという結果は得られなかつた。これに対して，実験 2（昭和 32 年度）では，紋枯病菌の菌核を葉鞘内に挟み込み，40 時間ビニールで覆つて接種を行つたため，接種葉鞘ではほとんど発病を見，特に次葉鞘接種水稲では止葉まで病斑を形成しているものも相当見うけられた。このため，水稲の生理機能に相当の影響を及ぼしたことが考えられ，対照区に比べて，稲小粒菌核病被害度の増大が認められた。即ち，次葉鞘，3 葉鞘が紋枯病に侵されて，水稲の活力が衰え，小粒菌核病の被害度が増進したものと思考される。この反面，実験 1 にみるごとく紋枯病の被害度が軽少の場合には，小粒菌核病の被害には影響がないことがわかつた。河合[1]はウンカにひどく犯された水稲では小粒菌核病の被害度が 3 倍以上になることを報告し，この場合も被害水稲の衰弱に原因することを予想している。著者は稲葉剪除と小粒菌核病の被害度について体内成分の変化を追究し葉身の剪除を行えば菌核の被害度を非常に助長することを明らかにしたが，実験 2 の次葉鞘まで紋枯病を接種した場合の小粒菌核病被害度の増大も，稲葉剪除の影響と似かよつているのではないかと考える。

Ⅳ. 摘　要

1．穂首イモチ，節イモチ及び紋枯病が稲小粒菌核病の被害度に及ぼす影響を試験した。

2．節イモチは稲小粒菌核病の被害度を非常に助長するが，穂首イモチでは，ひどくイモチに侵された場合に被害度を軽減せしめる傾向がある。

3．紋枯病の被害度が軽少な場合は小粒菌核病の被害度に影響は見られないが，紋枯病の被害の大きいときは，小粒菌核病の被害度を助長する。

(1957年12月17 日受理)

引 用 文 献

1）河合一郎 ： 農林省静岡農事改良実験所，昭和23年度成績 (1949).
2）西沢正洋 ： 日植病報，17 ：137～140. (1953).
3）野中福次 ： 農及園，30 ：71～72. (1955).
4）――： 九大農学芸雑誌，15 ：1～5. (1955).
5）――： 九大農学芸雑誌，15 ：7～14. (1955).
6）――： 九大農学芸雑誌，15 ： 171～177. (1955).
7）――： 九大農学芸雑誌，15 ： 431～434. (1956).
8）吉村甫，他 ： 昭和 24 年度農林省委託試験報告 (1950).
9）吉村彰治 ： 日植病報，19 ： 58～60. (1955).
10) 吉井甫・木場三朗・渡辺文吉郎：日植病報，13 (3，4) ：19～22. (1947).

Résumé

The influences of neck and node blast caused by *Piricularia oryzae* and of sheath spot caused by *Corticium sasakii* on the severity of stem rot(*Leptosphaeria salvinii*) were studied.

The severity of stem rot increases when the same stem is affected with node blast, while the resistance to the stem rot increases when it is heavily affected with neck blast.

The severity of stem rot does not increase by the light damage of sheath spot, but decidedly increases by the heavy.

(Faculty of Agriculture, Kyushu University).

雑　　録

軟腐病菌 (*Erwinia carotovora*) の系統に関する研究

Ⅱ．鞭毛抗原及び菌体抗原の熱による不活性化について

後　藤　正　夫・岡　部　徳　夫*

Masao GOTO, Norio OKABE; Studies on the strains of *Erwinia carotovora* (Jones) Holland
Ⅱ. Heat inactivation of flagellar and somatic antigens.

I. 緒　　言

一般に細菌の鞭毛抗原は易熱性であり，菌体抗原は耐熱性であるといわれている。即ち前者は 70°C 15分の加熱によつて抗原性を失う（木村，1994）[4]が，後者は 100°C 2 時間の加熱にもよく耐えるといわれている。しかし抗原の耐熱性に関する研究は，植物病原細菌では殆んど皆無の状態にあるので，果してこの概念が総ての細菌種に共通の性状として，一般化しうるか否か少からぬ疑問がある。著者らはさきに *E. carotovora* (aroideae type)のある種の系統において鞭毛抗原が約 60°C 10 分の加熱によつて不活性化し抗原性を失う事実を認め，しかも系統によつて温度に若干相違のあることを明らかにした。又鞭毛を欠くある菌株の菌体抗原は，他の菌株の鞭毛抗原に相当するものであり，しかもこの菌体抗原は比較的低温で抗原性を失うことも認めた。この様に *E. carotovora* の抗原性と不活性化温度との関係は，一般細菌学の概念とはかなり異り，しかも系統によつて異ることも明らかになつたので，再びこの問題を系統的な観点から検討し，新たな知見を得たので取纏めて報告する。

本稿を草するに当り，種々有益なる助言を賜つた千葉大学医学部川喜田愛郎教授に深厚なる感謝の意を表する。

II. 鞭毛抗原の熱による不活性化

著者らは既報において，*E. carotovora* の B (P2), C (P7), 及び A (C1) 血清型の鞭毛抗原が，夫々 58°C 及び 63°C 10 分の加熱によつて不活性化され，鞭毛凝集反応が阻止されることを報告した。そしてこの原因は鞭毛の質的変化にあり，凝集反応の第一段階である抗体の吸収が阻害されるためであると考えた。その後著者らは，新らたに 9 種の血清型を使つてこの問題を究明した。

A. 実験方法 i) 菌の培養及び加熱　グリセリン寒天斜面培養（24 時間）から釣菌して蒸溜水に懸濁する。菌の濃度は凝集反応用菌液の 3〜4 倍とする。この菌液を直径及び厚さの均一な中試験管に 2ml 宛分注し，正確に 10 分間加熱した後，直ちに冷却する。温度の変化は ±1°C 以内に止めた。ii) 凝集反応　血清は 80 倍から倍数稀釈し，内径 4 分の反応用試験管に 0.5ml 宛分注する。一方加熱菌液は生理的食塩水で 3〜4 倍に稀釈し，0.5ml 宛分注する。試験管は 37°C に保ち，2 時間後に凝集価を調べた後，氷室に 24 時間放置して再び調べた。しかし菌体抗原の反応（80〜320 倍）と誤ることを避けるため，24 時間後の結果は参考に止めた。

B. 実験結果 I）各血清型の鞭毛抗原の不活性化温度：既報の 3 血清型を含む 12 種類の血清型について，夫々血清の採取に使つた代表菌株の蒸溜水中における鞭毛抗原の不活性化温度を調べた。その結果を一括して示すと第 1 表の如くである。

即ち *E. carotovora* の鞭毛抗原は不活性化温度よりみると，i) 60°C 以下 (B, C 及び E 血清型), ii) 60°〜70°C (A, D, F, G, H, I, J, 及び L 血清型), iii) 70°C 以上 (K 血清型) の 3 群に大別することが出来る。この温度は ±1°C の範囲内で実験的に再現し得るので，各血清型の鞭毛に備つた特徴と考えられる。しかし既報の如く各鞭毛は多数の因子抗原より構成されており，しかも因子抗原の種類によつて同じ鞭毛を構成するものでも不活性化温度の異る場合がある。従つて第 1 表に示した温度はそれぞれの血清型の鞭毛

Table 1. Heat inactivation temperatures of flagellar antigens of various serotypes of *E. carotovora*.

Serological group	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Serotype	C1	P2	P7	P14	BC	BA	CⅦ	R1	O7	PMⅡ	Chr.1	CP
Inactivation temperature* (°C)	63	58	58	65	58	65	63	63	60	63	78	63

* No agglutination occured on the flagellar antigens heated for 10 min. at this temperature.

* 静岡大学農学部

を構成する因子抗原の内で，熱に最も安定な抗原の不活性化温度を示したものといい得る。

II)同一型血清群に属する菌株の鞭毛不活性化温度：同一型血清群に属する菌株間に不活性化温度の相違があるか否かを調べる目的で，第1表にあげた代表的菌株と同一凝集価で反応する数菌株を用いて，前述の方法に従い不活性化温度を調べた。ただし数種の血清型は極めて特異的で，他に同一凝集価で反応する菌株がないので，凝集価は低くても一部の鞭毛抗原を共有すれば実験に用いることにした。結果を一括して第2表に示す。

A及びE型血清群以外では菌株間に不活性化温度の相違がみられた。これを既報の抗原構造をもとにして分析してみると次の如くである。i) A型血清群：このグループの所謂a抗原は5つの相異る因子抗原から成づている。そして上にあげた5菌株に共通した抗原は a_2 及び a_4 抗原である。従つて少くともこの2つの抗原は 63°C で不活性化するものと考えられるが，他の因子抗原の不活性化温度については，この結果のみでは明らかでない。

ii) B型血清群：58°C で不活性化する P2 及び P28 菌株と，56°C で不活性化する P12 及び P31 菌株の間には，抗原構造上明らかな相異がある，即ち両者に共通な因子抗原 (b_1,b_2) 以外に，前者は b_3 抗原を有する。従つてこの結果から判断すると b_1,b_2 抗原はその何れか一方或は両方が 56°C で不活性化し，b_3 抗原は 58°C で不活性化する因子抗原と考えられる。

iii) C型血清群：55°C で不活性化する P8 及び Sp5 菌株には因子抗原 C_1 及び C_3 が存在し，58°C 不活性化菌株には C_2 抗原が存在する。従つて C_1 及び C_3 は 55°C で，C_2 は 58°C で不活性化するものと考えられる。

iv) D型血清群：65°C で不活性化する P14 菌株と C18 菌株は同じ抗原構造 (d_1,d_2) を有する。これに対して P21 は d_2 抗原を，C2 は d_1 抗原を有する。この結果から判断すると d_1 抗原は 63～65°C d_2 抗原は 50°C で夫々不活性化するものと解釈される。

v) E型血清群：BC菌株は e_1 及び e_2 抗原を有し，C16 は e_1抗原を有する。両抗原の熱に対する性質は同一であるように思われる。

vi) F型血清群：P31菌株と C13 菌株の f 抗原割分は異り，夫々 f_2,f_1 としたが，これらは何れも 58°C で不活性化する。これに対し BA の 65°C における不活性化は本菌株にのみ存在する f_3 抗原によるものと考えられる。

Table 2. Heat inactivation temperatures of flagellar antigens in some isolates of the same serological group.

Serological group	A					B				C					
Serotype	(C1)	C16	C21	P13	P16	(P2)	P12	P28	P31	(P7)	P1	P8	P24	P29	SP5
Inactivation temperature (°C)	63	63	63	63	63	58	56	58	56	58	58	55	58	58	55

D				E		F			G			H		
(P14)	P21	C2	C18	(BC)	C16	(BA)	C13*	P31*	(CⅦ)	P18*	Pot.5*	(R1)	Tob.9*	Cab.R*
65	50	63	65	58	58	65	58	58	63	55	55	63	63	50

I		J		K					L				
(O7)	O8	(PMⅡ)	Pot.29*	(Chr.1)	C1*	P4*	P7*	P13*	(CP)	P18	Sp5	Pot.1	O10
60	60	63	58	78	63	58	58	63	63	55	55	60	58

* Against the antisera these isolates were agglutinated at lower titers (1,280～2,560) compared with those (10,240～20,480) shown by the homologous isolates.

Isolates in the brackets show the type cultures used for the preparations of antisera for diagnoses of serological groups.

vii) G型血清群：P18 及び Pot.5 の g 因子抗原は g_2 で，CⅦ 菌株はこの他 g_1 を有する。前者は 55°C，後者は 65°C で不活性化するものと考えられる。

viii) H型血清群：Cab.R は h_1 抗原を有するのに対し，Tob. 9 は h_1,h_2，R1 菌株は h_1，h_2，h_3 抗原を有する。h_1 抗原は 50°C，h_2 抗原は 63°C で不活性化する。H血清を Tob.9 菌株で吸収して h_3 因子血清を作り，R1 菌の h_3 抗原の不活性化温度を調べると h_2 抗原と同じく63°Cで不活性化することが判つた。

ix) I型血清群：この血清に凝集反応を起す菌株は

O7 及び O8 の 2 菌株のみで，抗原 i の不活性化温度は60°C であつた。

x) J 型血清群：PM II 菌株は，j_1，j_2，Pot. 29 菌株は j_2 抗原を有すると考えられる。従つて j_2 抗原は 58°C，j_1 抗原は 63°C で不活性化するものと考えられる。

xi) K型血清群：菊から分離した菌株は総てこの血清型に入り，代表菌株 Chr. 1 と同じ凝集価で反応する。これらは何れも Chr. 1 と同じ 78°C で不活性化する。C1，P4，P7 及び P13 菌株は A 及び C 血清型に属するものであるが，Chr. 1 血清に対し夫々低い凝集価で反応する。そしてこれらの鞭毛抗原の不活性化温度は夫々 a 又は c 抗原の不活性化温度に等しい。

xii) L型血清群：このグループの抗原構造は甚だ複雑で，まだ充分明らかでない。従つて第2表にあげた不活性化温度に因子抗原を組合せて考察することは出来ないが，吸収試験の結果と比較してみると，この血清型の不活性化温度は後述するように2種以上の因子抗原の組合せによる干渉作用がある様に考えられる。

III) K 血清型 (Chr. 1) の抗原構造及び本菌に存在するA抗原の不活性化温度：既報で岡部，後藤は P7 菌株が K (Chr. 1) 血清に凝集反応を示すのに対し，Chr. 1 菌株が C (P7) 血清に反応を示さない点を，P7 菌株にK抗原が存在するためであると説明した。しかし交互凝集反応（第3表）及び吸収試験（第4表）の結果をよくみると，P7 菌株にはK抗原が認められず，逆に Chr. 1 菌株に c 抗原の存在が認められる。そして Chr. 1 菌株が P7 血清に反応しないのは，Chr. 1 菌株に存在するk及び a 抗原による凝集反応阻止作用に原因するものと解せられる。この様な現象は既に ROSEATHAL and COX[10,11] (*Corynebacterium michiganense, C. insidiosum*) や岡部，後藤 (*Pseudomonas solanacearum*) によつて証明されている。従つて Chr. 1 菌株の抗原構造は，本菌に特異的な k 抗原と a 抗原の一部及び c 抗原の一部より構成されているものと解釈される。

Table 3. Cross agglutination tests between the strains of K group.

Serum / Antigen	K (Chr. 1)	A (C1)	C (P7)
Chr. 1	20,480	2,560	0
C1	5,120	10,240	0
P7	2,560	0	40,960

Table 4. Adsorption experiments with K-serum.

Antigen	Titer before adsorption	Adsorbed with Chr. 1	Adsorbed with C1	Adsorbed with P7
Chr. 1	20,480	0	2,560	10,240
C1	5,120	0	0	2,560
P7	2,560	0	320	0

前述の如く K 血清を作つた場合には，a 抗原及び c 抗原は夫々 A 血清及び C 血清を使用した場合と全く同じ不活性化温度を示した。この事実は Chr. 1 菌株の a 及び c 抗原には，夫々不活性化温度の最も高い a_2 又は a_4 及び c_2 因子抗原が含まれていることを示唆する。

次に Chr. 1 菌株に含まれる a 抗原の不活性化温度を，A 血清を使用して調べた結果，次の如くであつた(第5表)。即ち同じ a 因子抗原でも Chr. 1 菌体上に存在する場合には，不活性化温度が著しく異る事実が明らかになつた。しかも a 抗原の不活性化温度が共存する k 抗原のそれに近似していることも興味がある。これは異種抗原が一つの菌体上に混在する場合，抗原間において不活性化温度に干渉を示すものと考えられ，注目すべき例と考えられる。

Table 5. Heat inactivation temperatures of a-factor flagellar antigens in Chr. 1 (K group) and C1 (A group) isolates.

Antigen	A (C1) Serum	K (Chr.1) serum
Chr. 1	75°C	78°C
C1	63°C	63°C

III. 菌体抗原の熱による不活性化

著者らは既報において数株の無鞭毛性菌の菌体抗原が70°C, 10 分の加熱によつて凝集反応を消失することを認めた。即ち菌体抗原には比較的低温で抗原性を失う易熱性抗原と，100°C の加熱に安定な耐熱性抗原との2種類があり，前者は他の菌株においては鞭毛を構成する抗原であることを明らかにした。次に 70°C 10 分の加熱によつて鞭毛抗原及び易熱性菌体抗原を不活性化し，耐熱性の菌体抗原のみを使つて交互凝集反応を行つた結果，*E.carotovora* では菌体抗原が鞭毛抗原に比べて狭い凝集反応域を示すことを認めた。しかし鞭毛性の生菌で得た血清は，菌体凝集価が著しく低く，せいぜい 80～320 倍程度である。そこで著者らは 100°C 1時間加熱菌体の注射によつて得た菌体抗血清を用いて凝集反応を行い第6表の如き結果を得た。

一般にO血清の凝集反応は OH 血清を用いた場合

Table 6. Cross agglutination tests with somatic antigens.

Serum	A		B		C		D		E		L	
Isolate used for preparation of serum	C1		P2		P7		P14		BC		CP	
Antigen	OH*	O**	OH	O	OH	O	OH	O	OH	O	OH	O
P1***	0	0	160	1,280	0	0	0	320	0	0	0	0
2	0	0	320	1,280	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	160	0	0	0	0	0	160	0	0	0
4	0	0	160	1,280	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	1,280	0	80	0	80	0	0	0	0
6	0	0	320	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	320	1,280	0	320	0	0	160	320
8	0	0	0	0	320	1,280	0	160	0	0	160	320
9	160	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	320	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	160	1,280	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	1,280	0	1,60	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	640	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	160	640	0	0	0	0
15	0	0	0	0	80	0	0	0	0	0	320	640
16	160	1,280	0	0	80	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	80	80
19	0	0	0	1,280	80	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	160	160
22	320	0	0	0	320	0	0	0	0	0	160	80
24	0	0	0	0	320	0	0	320	0	0	0	0
28	0	0	320	1,280	160	0	0	0	0	0	0	0
29	0	0	0	1,280	160	160	0	320	0	0	0	0
31	0	0	160	0	160	0	0	0	160	0	0	0
SP2	0	0	320	1,280	80	0	0	0	80	0	0	0
SP5	0	0	0	0	320	0	0	0	0	0	80	80
SP7	0	0	0	0	820	0	0	0	0	0	0	0
C1	320	1,280	0	0	320	0	0	640	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	320	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	80	0	0	0	0
4	0	0	0	0	160	80	0	640	0	0	0	0
5	80	1,280	0	0	0	0	0	640	0	0	0	0
6	80	80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	160	1,280	0	0	0	0	0	640	0	0	0	0
10	320	1,880	0	0	0	0	0	640	0	0	0	0
11	80	80	0	0	320	0	0	0	0	0	0	0
12	80	1,280	0	0	0	0	0	640	0	0	0	0
13	160	640	0	0	160	160	0	640	0	0	0	0
15	160	1,280	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	80	1,280	0	0	0	0	0	320	0	0	0	0
17	320	1,280	0	0	0	0	0	640	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	160	640	0	0	0	0
19	320	1,280	0	0	0	0	0	640	0	0	0	0
20	160	640	0	0	0	0	0	640	0	0	0	80
21	320	0	0	0	160	0	0	0	0	0	0	0
BA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,280	0	0
CP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	320	640

*–Normal sera prepared with the living flagellated bacteria.

**–Somatic sera prepared with the heat-killed bacteria.

***–Heated and living bacteria were used in the case of normal and somatic sera, respectively.

に比べて，反応する菌株の数が減少する。これは一部の菌体抗原が 100°C, 1 時間の加熱によつて破壊され，抗体の産生を欠くためであると考えられる。しかしD血清型（P14）は,OH血清に比べてO血清が著しく広い凝集域を示し，特に A group の菌体抗原に対して凝集範囲を拡大する点が注目される。これはD血清の採取に使つたP14菌株の細菌細胞表層が易熱性のD抗原(100°C,1時間の加熱によつて破壊）によつて占められ，その下に耐熱性のA及びD菌体抗原からなる抗原層を有するためと考えられる。故に生菌によつて得た血清（OH）は，表層にD抗原を有する細菌に対してのみ凝集反応を示すのに対し，加熱死菌によつて得たO血清は，a, d 両抗体を含むためA型血清群の菌株をもよく凝集するものと考えられる。この様にD血清型の耐熱性菌体抗原は明らかに類属凝集反応を示すものであり，凝集反応域のせまい鞭毛抗原は型特異性反応と考えられる。これは Salmonella 菌と同じで,菌体,鞭毛抗原の特異性は Salmonella とは逆の，むしろ Proteus 菌と同じ構造を有するという *E. carotovora*の血清学的特徴（Elrod, 1941）と異つた特殊な血清型であるよ

うに思われる。

一方 B, C, 及び L 型血清群の一部においても，OH 血清に全く無関係の菌株が加熱菌体によつて得たO血清に対して凝集反応を示すのがみられる。これも又D血清型と同様に抗原の層構造によつて説明し得る。

IV. 考 察

以上の実験により *E. carotovora* の鞭毛抗原が，血清型又は因子抗原の種類により 50～78°C の種々の温度で不活性化することが明らかとなつた。そしてこの事実は血清学的実験の遂行上に利するところが少くない。即ち従来，因子血清を得るためには多数の菌株の中から目的とする因子抗原のみを欠く菌株を取出して吸収するか，2種以上の菌株を組合せて吸収することによりこの目的を達してきた。しかし因子抗原の不活性化温度が明らかに異る場合には，血清の採取に用いた菌株を一定温度で加熱し，熱に不安定な抗原を不活性化した菌体を用いて血清を吸収すれば不活性化温度の高い因子抗原に対する特異性血清を得ることが出来る。この方法は操作が簡便であるが，不活性化温度の低い因子抗原に対しては用いることが出来ない点で尚研究の余地がある。又加熱によつて一部の抗原を不活性化した菌体を用いて血清を採取すれば理論的には，無処理の生菌を用いて採取した血清よりも特異性の高い血清が得られる筈である。しかし，抗原の熱による不活性化を血清学的研究法に実際に取入れるためには更に今後の研究が必要である。

同一型血清群に属する細菌でも，更にこれを因子抗原に分けてみると，不活性化温度に大きな相違があることが判つた。D, H, K 型血清群では不活性化温度の低いものと高いものでは 10～20°C の開きがある。しかしこれらは異株菌体上に存在する抗原について調べた結果であり，同一菌体上にこれらが混在する場合の不活性化温度は以上の結果のみでは明らかでない。そこで B, C, D, G 及び H 型血清を吸収して夫々の因子血清を作り，同じ菌体上に存在する抗原を加熱して因子抗原毎に不活性化温度を調べたところ，第2表から分析したものと同じ結果が得られた。従つてこれらの血清型群では鞭毛抗原の血清学的性質と不活性化温度との間に密接な相関性があるものと考えられる。しかし Chr. 1 菌株 (K group) ではこれと全く異つた結果が得られた。この菌株は k, a 及び c 抗原を有するが，k 抗原のみを持つた菌株がまだ発見されないので，K 血清を吸収して a 抗体のみ含む因子血清を作ることが出来ない。そこで A 血清を用いて Chr. 1 菌株に存在する a 抗原の性質を調べてみると，k 抗原と共存する a 抗原は単独で存在する場合に比べて著しく熱に安定であることが判つた。この事実は鞭毛抗原はその組合せの如何によつては，不活性化温度と血清型との関係が必ずしも一定していないことを物語つており，不活性化温度の相違と血清型との関係を究める場合に，このような現象を充分理解していなければならない。

次に抗原の不活性化温度を支配する条件の一つに，加熱する場合の菌の懸濁液がある。生理的食塩水を用いると，蒸溜水に比べて 2～3°C 高い不活性化温度を示し，又肉汁寒天斜面に蒸溜水を流し込んで作つた菌液を用いた場合にも凝固水等培地成分の影響によつて 2～3°C 高い温度を示すことが判つた。この点にも注意する必要がある。

Elrod (1941) は 100°C で加熱した菌体を用いて凝集反応を行つた結果，鞭毛凝集反応に比べて著しく反応域が狭く，型特異性反応が菌体抗原によつて起ることを認めた。しかし著者らは 100°C, 1時間加熱菌体の注射によつて得たO血清を用いて検査した結果，D型血清が著しく反応域を拡大することを認めた。生菌によつて得た OH 血清による鞭毛凝集反応は著しく特異性が強いので，D血清型に関する限り，Salmonella 菌と同様，耐熱性菌体抗原が群特異性 (group specificity) を示すものと考えられ，Elrod によつて最初に指摘された菌体抗原型特異性の概念は必ずしも *E. carotovora* の特徴として一線を劃し得るものではないことが明らかになつた。著者は P14 株におけるこのO－凝集反応の特徴を菌体抗原の層構造によるものと考えた。即ちこの菌株では菌体表層と内部とで抗原構造が異り，菌体を 100°C, 30 分加熱することによつて表層の菌体抗原は破壊されて内部の抗原が露出するためであると考えた。大腸菌においては菌体抗原 (O抗原) の表層に莢膜抗原 (K 抗原) の存存が認められており，このためO血清の採取に当つては菌体を 100°C 2 時間乃至 120°C, 1 時間加熱して K 抗原を破壊している。 *E. carotovora* の菌体表面に存在する易熱性抗原が大腸菌の K 抗原に相当するものか否かについては更に究明を要するが，P14 以外の菌株においても加熱菌体上に抗原劃分の消失或は新たな出現がみられることは菌体抗原の層構造を示唆するものと考えられる。この点については更に今後の研究によつて確認したいと考えている。

V. 摘 要

1. *E. carotovora* の鞭毛抗原及び菌体抗原の熱による不活性化の問題を研究した。

2. 12 血清型の代表的菌株を用いて行つた実験では鞭毛抗原は 58～78°C, 10 分の加熱によつて不活性化し，抗原性を喪失する。この温度は血清型によつて一定し，±1°C の範囲内で再現し得る，

3. 鞭毛抗原は普通 2 種以上の因子抗原から構成されているが，血清型によつては因子抗原の種類によつて不活性化温度を異にする。

4. K血清型 (Chr. 1 菌株) の鞭毛抗原は k, a, 及び c 抗原から構成されている。a 抗原は単独で存在する場合は 63°C で不活性化するが k 抗原（不活性化温度 78°C）と共存する場合には 75°C で不活性化する。抗原の組合せ如何によつて不活性化温度が異る例として注目に価する。

5. 無鞭毛菌の一部の 菌体抗原(P8 株の c_1, c_3)は 55°C 10 分の加熱によつて抗原性を失う。

6. 100°C, 1 時間の加熱死菌の注射によつて得た O血清の菌体凝集反応は，生菌注射によつて得たOH 血清の菌体凝集反応に比べて一般に反応菌株の数が減少する。しかし D 血清型はこの逆で D 及び A 血清型の菌体抗原と広く反応する。即ちこの血清型では類属凝集反応が耐熱性の菌体抗原によつて起り，他の *E. carotovora* の血清型と逆の関係にある。

(1957 年 6 月 25 日受理)

参 考 文 献

1) Bergey's Manual of determinative bacteriology. 6 th. ed. (1948).
2) Elrod, R. P.: Bot. Gaz., 103: 123～131.(1941).
3) Elrod, R. P.: Bot. Gaz., 103: 226～279.(1942).
4) 木村廉：細菌学及び免疫学. (1949).
5) 小島三郎・八田貞義：食物中毒菌. (1941).
6) 小島三郎・滝田順吾編：腸内細菌. (1955).
7) 岡部徳夫・後藤正夫：静大農研究報告， 5: 72～86. (1955).
8) 岡部徳夫・後藤正夫：静大農研究報告， 6: 16～32. (1956).
9) 岡部徳夫・後藤正夫：静大農研究報告， 4: 41～60. (1954).
10) Rosenthal, S. A. and C. Cox: Jour. Bact., 65: 532～537. (1953).
11) Rosenthal, S. A. and C. Cox: Phytopath., 44: 603～604. (1954).
12) 坂崎利一・波岡茂郎：腸内細菌検索法. (1956).

Résumé

1. Researches were made on heat inactivation of flagellar and somatic antigens of *Erwinia carotovora* against agglutination reaction, with the results mentioned below.

2. Flagellar antigens of 12 serotypes, heated in distilled water at 50° to 80°C for 10 min., and agglutinated by their homologous antisera, proved to be inactivated by heating at various degrees of temperatures from 58° to 78°C according to serotypes, these inactivation temperatures being repetitious within a limit of ±1°C.

3. Differences of inactivation temperatures corresponding to antigenic components in a flagellar antigen were demonstrated to exist in some serotypes.

4. In serotype K, the flagellar component a was inactivated at 75°C in the existence of k and c components, although the former was inactivated at 63°C in the case of a alone. This difference of the inactivation temperatures appeared to owe to a mutual effect between the flagellar components of serotype K on the thermal inactivation against agglutination reactions.

5. Somatic antigens of a non-flagellated strain, inactivated by heating at 55°C for ten minutes, lost their agglutinativity.

6. In most serotypes, isolates agglutinated with O-antiserum prepared by injections of bacteria heated at 100°C for one hour were lesser in number than those agglutinated with OH serum. But, in serotype D, this relation was reverse.

These were responses due to the layer construction of somatic antigen components

(Faculty of Agriculture, Shizuoka University)

Fusarium 属菌の fusarin 酸産生について*

西村　正暘**

Syoyo NISHIMURA : Observations on the fusaric acid production of the genus *Fusarium.*

Fusarin 酸は最初稲馬鹿苗病菌 (*Gibberella Fujikuroi*) の分泌する稲苗の生育阻害物質として発見されたが[10]，近年にその植物細胞に対する著しい害作用が再認識[5,7,9]されると共に，数種の *Fusarium* 属菌―トマト萎凋病菌 (*F. oxysporum* f. *lycopersici*)[1]，甘藷蔓割病菌 (*F. oxysporum* f. *batatas*)[4] 棉萎凋病菌 (*F. oxysporum* f. *vasinfectum*)[2] 及び西瓜蔓割病菌(*F. oxysporum* f. *niveum*)[6]―で相次いで見出されるに至つた。そこで筆者は *Fusarium* 属菌の fusarin 酸代謝は普遍的なものであるか，それともある species 或はある forma に限られているものかといつた疑問を抱くに至つた。しかも fusarin 酸は最近諸氏[3,6,8]によつて，萎凋病におけるvivo-toxin として是認されてきているので更に興味を感じ若干の実験を行つた。

供試 *Fusarium* 菌は当研究室の保存菌と信州大学松尾卓見並びに徳島農試石井博両氏から分譲されたもの合計25系統を用いた。なお対照の意味で *Fusarium* 菌以外のものを数種併用した。fusarin 酸産生の確認並びに定量法は既報[6]に準じたがその概要を記すと，先ず 300c.c. 内容三角 flask に RICHARDS 氏液体培地を 100c.c. ずつ分注したものにそれぞれの菌株を 26～28°C で 2 週間培養した。その培養沪液 100c.c. について既報で述べた手順により fusarin 酸の fraction を分割し，最後に 95% EtOH 溶液として spectrophotometer で紫外線吸収スペクトルを画いて fusarin 酸特有の曲線[6]か否かを検討すると共に更に 268 mμ における吸光度を測定した。後 $Y=0.0231X-0.0093$ [ここで Y は 268 mμ における吸光度を，また X は fusarin 酸濃度 (γ/c.c.) を示す] により fusarin 酸濃度を求め，ついで培養沪液 100c.c. 中の mg 単位に換算した(表)。

その結果を考察すると，*Fusarium* 属菌の fusarin 酸産生は普遍的でなく種間で可成り明瞭な相違が見られる。本実験では未だ供試菌の数が多くないので断定する処まで云えないが，*oxysporum* と *moniliforme* に属するものは一般に fusarin 酸代謝を行つているが，供試した他の species ではそれが認められなかつた。しかし *oxysporum* と *moniliforme* との fusarin 酸分泌量はそれぞれの strain 間で可成りの差異が認められるので，どの species 或は forma が代謝量が多いかは一概には云えないようである。

fusarin 酸を産生する上記 2 つの species は共に根部からの侵入菌であり，また萎凋或は立枯病を起すと云うことは fusarin 酸が細胞毒的な[6] vivo-toxin であることから考えて萎凋病の病理機作上興味ある問題と思う。

本報文の校閲を賜つた広江勇教授並びに供試菌の分譲を戴き且つ種々御教示を賜つた信州大学松尾卓見並びに徳島農試石井博の諸氏に深甚の謝意を表する。

Fusarium 属菌の fusarin 酸産生　Fusaric acid production by some *Fusaria.*

供試菌名 Name of *Fusaria* used		菌体重 Myc. Wt.*	収量 Yield**	備考 Remark ***
				トマト萎凋菌
F. oxysporum f. *lycopersici*	No. 1	0.295	0.846	四国農試保存菌
F. oxysporum f. *lycopersici*	No. 2	0.280	0.630	岡山県真庭郡 (1955)
F. oxysporum f. *lycopersici*	No. 3	1.303	0.345	鳥取市浜坂 (1955)
F. oxysporum f. *lycopersici*	No. 6	0.297	0.768	鳥取市十六本松 (1955)
F. oxysporum f. *lycopersici*	R-5-6	0.452	1.693	ウイスコンシン大保存菌
F. oxysporum f. *lycopersici*	A-158	0.306	1.351	ウイスコンシン大保存菌
				西瓜蔓割病菌
F. oxysporum f. *niveum*	No. 1	0.210	1.052	醗酵研保存菌
F. oxysporum f. *niveum*	No. 2	0.228	0.540	鳥取市十六本松 (1954)

* 西瓜蔓割病の病理化学的研究（第 8 報）Pathochemical studies on watermelon wilt (Part 8) [農作物病害の病理化学的研究（邦文編）第XI報（鳥取大植病)]

** 鳥取大学農学部

F. oxysporum f. *batatas*	No. 4	0.285	1.863	甘藷蔓割病菌 長尾研保存菌
F. oxysporum f. *vasinfectum*	No. 1	0.283	3.540	棉萎凋病菌 醱酵研保存菌
F. oxysporum f. *nicotianae*	No. 1	0.675	0.697	煙草立枯病菌 鳥取市湖山 (1956)
F. solani	No. 1	0.291	0.000	長尾研保存菌
F. solani	No. 2	0.246	0.000	桑枝から分離 (1942)
F. solani	No. 3	0.770	0.000	馬鈴薯乾腐病菌 (1956)
F. lateritium	No. 1	0.204	0.000	桑芽枯病菌 京都府 (1942)
F. lateritium	No. 2	0.235	0.000	長野県更級郡 (1949)
F. lateritium	No. 3	0.262	0.000	埼玉県 (1951)
F. moniliforme f. *majus*	No. 1	0.290	1.530	稲馬鹿苗病菌 上田市 (1951)
F. moniliforme f. *majus*	No. 8	0.236	1.697	鳥取県 (1956)
F. moniliforme f. *majus*	No. 9	0.437	0.782	鳥取県 (1956)
F. moniliforme		0.277	0.745	大豆立枯病菌 熊本県 (1952)
F. roseum f. *cerealis*	No. 1	0.471	0.000	麦類赤黴病菌 倉敷市 (1949)
F. roseum f. *cerealis*	No. 2	0.398	0.000	上田市 (1956)
F. roseum f. *cerealis*	No. 3	0.303	0.000	上田市 (1956)
F. nivale		0.171	0.000	麦類紅色雪腐病菌 新潟県中頸城郡 (1952)
Sclerotinia Kusanoi		0.357	0.000	桜菌核病菌
Hypochnus Sasakii	No. 3	0.203	0.000	稲紋枯病菌
Cochlibolus Miyabeanus	No. 13	0.927	0.000	稲胡麻葉枯病菌
Alternaria Kikuchiana	No. 23	0.431	0.000	梨黒斑病菌

* The fungus was respectively cultured for two weeks at 26～28°C, in Erlenmeyer flask of 300 cc capacity 100 cc of RICHARDS' sol'n.

** Shown with fusaric acid mg. contained in 100 cc culture filtrate.

*** Having Japanese common name, and host name, place or time which pathogen was isolated.

引 用 文 献

1) Gäumann, E., St. Naef-Roth and H. Kobel: Phytopath. Z., 20: 1～38. (1952).
2) Kalyanasundaram, R. and C. S. Venkata Ram: Jour. Indian Bot. Soc., 35: 7～11.(1956).
3) Lakshminarayanan, K. and D. Subramanian: Nature, 176: 697～698. (1955).
4) 宗像桂: 日農化大会 1952 年講演
5) Naef-Roth, St. and P. Reusser: Phytopath. Z., 22: 281～287. (1954).
6) 西村正暘: 日植病報, 22: 215～219. (1958).
7) Reusser, P. and St. Naef-Roth: Phytopath. Z., 26: 271～296. (1956).
8) Sanwal, B. D.: Ibid., 25: 333～384. (1956).
9) 玉利勤治郎・加治順: 日農化誌, 26: 223～227, 295～298, 298～303, 345～349, 349～353; 27: 245～249, 249～252, 302～306. (1952～1953).
10) 藪田貞治郎・神戸勝二・林武: Ibid., 10: 1059～1068. (1934).

Résumé

The faculty to produce fusaric acid in culture which is toxic to plant living cell was investigated by using the 25 strains belonging to 6 species of the genus *Fusarium*. In *F. oxysporum* and *F. moniliforme* all the forma specialis were positive, but the other four *Fusaria* employed in the present experiment were negative.

It might give an interesting problem in the study of pathological wilt-mechanism in plnat, that all the *Fusarium* belonging to *oxysporum* and *moniliforme*, have the faculty of fusaric acid production and then cause a systemic fusariose as wilting or damping off of host plant Moreover, application of investigating the faculty to produce such specific metabolite as fusaric acid in culture will be help in studying species relationship in Fusaria. (Lab. of Phytopathology, Fac. of Agricultute, Tottori University)

最近における植物病原細菌の分類について

III. グラム陽性菌及び根頭癌腫病菌

後 藤 正 夫*

Masao GOTO: Recent development in the classification of phytopathogenic bacteria.
III. Gram-positive bacteria and crown gall bacteria.

I. グラム陽性菌 — *Corynebacterium*

この属に入る植物病原細菌は以前には *Bacterium* (Migula), *Aplanobacter* (Smith), *Bacterium* (Lehmann & Neumann), 及び *Phytomonas* (Bergey et al.) 等の属名で呼ばれてきたが，これらには何れも菌体蛋白の本質的な相違に基くグラム反応に全く考慮が払われていなかつた。

Jensen[12,13] は多数の腐生性 *Corynebacterium* の研究に際して *Phytomonas insidiosa* 及び *P. michiganensis* に類似した Coryneform bacteria を認め病原性の確実なこれらの菌種と比較した結果，それぞれ *P. insidiosa* 及び *P. michiganensis* と同じ性質の持主であることを認めた。氏は更に McCulloch & Jones (1926) 及び Stapp (1930) の *P. insidiosa* 及び *P. michiganensis* に関する記載を詳細に調べた結果，これらは疑いもなく *Corynebacterium* であるとして，両菌をそれぞれ *Corynebacterium insidiosum*, *C. michiganense* と命名した。氏は同時に *Bact. sepedonicum* 及び *Apl. rathayi* について Stapp (1930) 及び Smith (1914) の記載を調べた結果，これらも *C. insidiosum* と同様 *Corynebacterium* に移すべきであると述べている。その後 Skaptason and Burkholder[22] は形態，生理的性質の類似点を指摘して *Phytomonas sepedonica* を *Corynebacterium sepedonicum* と改めた。Dowson[7] はグラム陽性の植物病原細菌について検討した結果，Jensen の 2 菌種の他に *Phytomonas sepedonica*, *P. rathayi*, *P. fascians* 及び *P. flaccumfaciens* の 4 種を *Corynebacterium* に移した。氏は *P. flaccumfaciens* は 1 本の極毛を有するが菌体の形態が *Corynebacterium* に一致すると述べ，又 *P. fascians* については Tilford (1936) 及び Lacey (1936) が記載している U. V. W. 及び Y 型の菌体は *Corynebacterium* 属菌の分裂過程における特徴であると述べ両者を *Phytomonas* からこの属に移した。

本属の植物病原細菌には *C. flaccumfaciens* の他 3 種の運動性細菌が含まれている。これは *Corynebacterium* の特徴に一致しない点であつて，Patel et al.[17] はこれを理由に，これらの菌種を本属から除くべきであると主張している。Bergey's Manual[2] では確実な Coryneform として *C. insidiosum*, *C. sepedonicum*, *C. michiganense*, *C. rathayi*, *C. agropyri* 及び *C. fascians* の 6 種をあげ，*C. hypertrophicans*, *C. flaccumfaciens*, *C. poinsettiae* 及び *C. tritici* の 4 種は極毛を有する点で真性の *Corynebacterium* とは異るとして一応 Appendix I に入れて取扱つている。しかし Starr[25] は *Streptococcus*, *Latcobacillus* 及び *Nocardia* の様な非運動性の属にも運動性の菌種は認められるし，又運動性を除く他の総ての点で *Corynebacterium* に一致しているならば運動性の相違のみによつてこれらの菌を除外する必要はないと述べている。

以上の様にグラム陽性の植物病原細菌は広く *Corynebacterium* 属菌として承認されているが，Patel ら[15] はこの属が元来動物病原菌及び腐生菌に対して設けられたものであるとの理由から *Cornebacterium* の代りに *Aplanobacter* Smith emend Patel and Kulkarni の使用を提案している。しかし氏らの *Aplanobacter* 属の記載をみると，無鞭毛のグラム陽性菌に限られており，運動性のグラム陽性菌は *Chlorobacter* 及び *Xanthomonas* 属に移されている。これは結果的にグラム反応を第二義的な性質とみなしており，Smith の分類の域を出ていない。従つて系統発生学的な立場に立つ近代の細菌分類学においては Starr[25] の説が最も妥当なものではないかと考えられる。次に Bergey's Manual に記載されている *Corynebacterium* 属の性質と，Patel et al. の *Aplanobacter* 属の性質を比較すると次の如くである。

***Corynebacterium* Lehmann and Neumann** 1896 (Bergey's Manual 6 ed. p. 381. 1948). 細長，真直又は稍彎曲した桿菌。不規則に染色する顆粒あり。先端が屢々棍棒状に膨らむ，Snapping division をし細菌細胞は角状又は柵状に配列する。非運動性（例外

* 静岡大学農学部

あり)。グラム陽性または不定性（若菌体または老菌体は陰性であるが顆粒は常に陽性)。一般に好気性であるが通性嫌気性及び嫌気性の場合あり。カタラーゼを生ず。ゼラチンを溶解または非溶解，硝酸塩を還元または非還元。糖類を醱酵するものとしないものがあるが，殆んど強い酸性にはならない。多くの種がグルコーズを分解し，肉眼的に確認出来るほど多量のガスを生ずることなく完全に CO_2とH_2O に酸化する。ある種の病原菌は強力な内生毒素を生ずる。自然界に広く分布するがヒト及び家畜に寄生する病菌が最もよく知られている。他に鳥，昆虫，幼動物，乳製品，水中，土壌中に分布しているが，数種は植物病原菌として知られている。Type species–*Corynebacterium diphtheriae* (Flügge) Lehm. and Neum.

***Aplanobacter* Smith emend Patel and Kulkarni** (Indian Phytopath. IV p. 77. 1951) 白色または種々の色の集落を作る。棍棒状，非運動性，グラム陽性，澱粉を糖化せず，脂肪を僅かに分解するか全く分解しない。ラクトーズを分解しない。ガスを生じない。M.R.及び V.P. 試験陰性，植物の萎凋を起す病原細菌。Types species–*Aplanobacter michiganense* Smith.

種名について　本属には現在のところ前にあげた 10 種の細菌が存在するのみであり，またこれらの細菌についての研究は他の属にみられる程豊富ではない。

Rosental (1952)[18]，Rosental and Cox (1953, 1954)[19,20] は，このグループの抗原構造について研究した結果，*C. poinsettiae* 及び *C. flaccumfaciens* は血清学的に区別がつかないが *C. sepedonicum* はこれらと全く異り，更にこの3者は*C. michiganense*及び *C. insidiosum* と血清学的関係が全くないことを明らかにした。そして更に *C. michiganense* 及び *C. insidiosum* は1個乃至それ以上の抗原因子を共通に有し，系統によつては両者は血清反応によつて区別がつかないことをも明らかにした。Starr (1946)[23] は6種の菌について栄養要求を研究したところ，総ての菌種の発育に，基本培地成分 (NH_4Cl, glucose 及び salts) 以外に Thiamine(*C. fascians*); amino acid, biotin, pantothenate 及び thiamine (*C. fluccumfaciens*, *C. poinsettiae*); amino acid, biotin, nicotinic acid, 及び thiamine (*C. insidiosum*, *C. michiganense*, *C. sepedonicum*) を絶対に必要とすることを明らかにした。

また最近発表された新種で，Bergey (1948) や Elliott (1951) の Manual に記載されていないものに次の4種がある[21,15,10,11]。

1. *Corynebaeterium humiferum* Seliskar (1952) (*Populus nigra* var. *italica*) 2. *C. musae* (Gauman) Magrou* (Banana) 3. *Aplanobacter fleuryi* Flenay et Francois**) (1948) (Pear) 4. *A. magroui* Francois (1948) (Pelargonium)

II. 根頭癌腫病菌と類似細菌—*Agrobacterium*

このgroupの細菌は代表的菌種である根頭癌腫病菌が Smith and Townsend (1907) によつて 1〜3 本の極毛をもつた細菌であると報告されて以来，長い間極毛菌と同じ属の中で取扱われてきた（*Pseudomonas* (Migula), *Bacterium* (Smith), *Bacterium* (Lehmann and Neumann), *Phytomonas* (Bergey et al.))。

Dowson (1939)[5]は *Bact. rhizogenes* が 3〜6 本の周毛を有することを認め，また *B. tumefaciens* は無毛であるが，無毛菌は *Pseudomonas* には存在せず大腸菌群に普通にみられること，及びその生理的性質 (salicin, lactose 及び maltose から酸を出す) は，本菌が周毛性グラム陰性桿菌に入ることを正当ならしめると述べて，両菌を大腸菌や植物軟腐病菌と共に *Bacterium* に移し，夫々 *Bacterium tumefaciens*, *Bact. rhizogenes* と命名した。

Bergey's Manual 第5版 (1939)[1] では，このグループの細菌が植物に対する病原性を除けば全くRhizobiaceae に似ている点をあげ，*Phytomonas* の中に Appendix II を設けてこれを取扱つている。Conn, Wolf, and Ford (1940)[4] は8種の癌腫病菌及び萎凋病菌について研究した結果，*Phytomonas tumefaciens* 及び *P. rhizogenes* は *Rhizobium* に極めてよく似ているため培養試験によつて区別することは不可能であると述べ，両菌が Rhizobiaceae に入ることは殆んど疑いないと結論した。其の後 Conn

*) 本菌はBergey et al.及び Elliott によりInvalid plant pathogen *Bact. musae*) とされていたが，Mauze et Merny (1950) はバナナ細菌病菌を本菌と同定した。これより先，Magrou は *Corynebacterium musae* と改めている。

**) 本菌が*Corynebacterium* であるか否か，原著によらなければ決定し得ないので，そのまま掲載する。

(1942)[8] は,根瘤菌がはつきりしたしかも容易に承認される属 Genus を形成することは疑いの余地がないけれども,根頭癌腫病菌及び根瘤菌を研究した細菌学者の協議によつて,根頭癌腫病菌や *Alcaligenes* に属する土壌細菌及びこれらと形態,生理的性質が類似している腐生菌を含む新しい属の必要性が認められたと述べ, これに対して *Agrobact. tumefaciens* を Type species とする *Agrobacterium* 属を提案し, *Alcaligenes radiobacter* 及び *Phytomonas rhizogenes* を本属に移した。そして Bergey's Manual (1939), Appendix II の中の数種及び *A. radiobacter* 類似の土壌細菌がこれに属すべきであると述べている。Bergey's Manual 6 版 (1948)[2] では *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. rubi*, 及び *A. radiobacter* を挙げ, *Agrobacterium* に属すると思われるがその関係が充分に確認されていないものに対し Appendix を設けて, *A. gypsophilae* 及び *Bact. pseudotsugae* を挙げている。Patel et al. (1951)[16] は *Agrobacterium* について "この属は癌腫病,根瘤病或は他の畸型を生ぜしめる植物病原細菌から成る属であるからこれを承認し, Rhizobiaceae から Phytobacteriaceae に移すのが適当である" と述べているが,前述の様に *Agrobacterium* は植物病原菌以外に *A. radiobacter* などの土壌細菌をも含むので Phytobacteriaceae Patel et al. に入れることは不可能なばかりでなく氏等の定義に従えば本属を承認することは出来ない筈である。

Starr[24] は *Agrobacterium* 属菌の栄養要求について研究した結果, *A. radiobacter*, *A. tumefaciens* 及び *A. gypsophilae* は N 及び C 源として NH_4Cl 及びグルコーズを含む合成培地で充分発育するが, *A. rhizogenes*, *A. rubi*, 及び *Bact. pseudotsugae* は biotin, nicotinic acid, glutamic acid, calcium panthonate, その他のアミノ酸を絶対に必要とすることを明らかにした。

Dowson の *Bacterium* 属の特徴は既に記したが, *Agrobacterium* 属の特徴は次の如きものである。

***Agrobacterium* Conn** 1942 (Bergey's Manual Ed. 6. p227. 1948) 短桿菌,典型的なものは1～4本の周毛を有する(1本の場合は極よりも側面に着生することが多い)。一般にグラム陰性,普通の培地でガスを生じないし,またリトマスで検出される程多量の酸を生じない。合成培地ではブロムチモルブルー時にはブロムクレゾールパープルで酸を検出出来る程多量のCO_2を生ずる。ゼラチンを極めて緩かに溶解するか全く溶解しない。遊離窒素を固定しないが一般に他の無機態窒素(硝酸塩又はアムモニューム塩)を利用する。最適温度は 25～30°C, 生存場所は土壌中,或は土中の植物根または植物の茎に寄生して増生病を起す。

Type species — *Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Townsend) Conn.

尚, Bergey's Manual には分類学的所属の不明な細菌から成る *Bacterium** 属がある。 *Bacterium* Ehrenberg についての Dowson の主張は既に紹介したが, Bergey et al. (1939, 1948) は,この属がはつきりした Type species を欠くとの理由から,無胞子桿菌で分類学上の位置が決定していないものに対してのみ用いられるべきであると主張する Breed and Conn (1936) の意見を採用し, 56 種を記載している。植物病原細菌では *Bact. pseudotsugae*, *Bact. stewarti*, *Bact. tardicrescens*, 及び *Bact. albilineans* の 4 種をあげ,更に Appendix を設けて罹病組織から分離されても病原菌と認められなかつたものを多数記載している。

Bact. pseudotsugae 及び *Bact. stewarti* は学者によつて, *Agrobact. pseudotsugae* 及び *Xanth. stewarti* と命名されていることがある。

附記(1)以上最近提案されたいろいろの分類方式について概略を紹介したが,これらの中で最も広く用いられるのは恐らく Bergey's Mannual of Determinative Bacteriology であろう。これはアメリカの各分野の細菌学者から成る委員会によつて編纂されているものである。本抄録の所々で指摘した様に不充分な点もかなり認められるが広範な細菌を系統的に分類し且つ新しい研究結果を次々と取入れて改版を発行する様絶えず努力が払われている点においてこの右に出るものはない。我が国でも植物病原細菌の分類にこの方式が推奨されている。

また 1948 年に Buchanan et al. によつて国際細菌命名規約 (International Bacteriological Code of Nomenclature: Jour. Bact. 55: 287—306) が発表され,吾が国では小南氏[14] が翻訳されている。植物病原細菌の分類を行う場合,或は新種を記載する場合に一読する価値があると考える。

稿を終えるに当り種々御教示を賜つた農技研向博士に深謝の意を表する。(1956年 6 月 15 日受理)

［後記］ 最近，細菌命名法国際委員会はこの属を科名 Bacteriaceae と共に正式に否認した (R. E. Buchanan: Ann. Rev. Microbiol., 9: 1-20. 1955)

引用文献

1) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 5 th. ed. (1939).
2) —— : Ibid. 6 th. Ed. (1948).
3) Conn, H. J.: Jour. Bact. 44: 353～360. (1942).
4) Conn, H. J., Wolf, G. E., and Ford, M.: Jour. Bact., 39: 207～226. (1940).
5) Dowson, W. J.: Zbl. Bakt. II. C: 177～193. (1939).
6) —— : Chron. Bot., IV: 197. (1941).
7) —— : Trans. Brit. Mycol. Soc., 25: 311～314. (1942).
8) Elliott, C.: Bot. Rev., 9: 655～666. (1943).
9) —— : Manual of bacterial plant pathogens. (1951).
10) Flenay, C. & M. Francois: Landw. Jahrb. Schweiz, 62: 786～790. (1948). (Biol. Abst. 23: 3119).
11) Francois, M: Compt. Rend. Acad. Sci. (Paris) 226: 115～116. (1948). (Biol. Abst. 24: 2035).
12) Jensen, H. L.: Proc. Linn. Soc., N. S. W. LVIII: 181～185. (1933).
13) —— : Ibid., LIX: 19～61. (1934).
14) 小南清：Nagaoa, 3. (1953).
15) Mause, J. & G. Merny: Rev. Path. Vég., 29 (3): 165—167. (1950). (R. A. M 30: 478).
16) Patel, M. K. & Y. S. Kulkarni: Indian Phytopath., 4: 74～84. (1951).
17) Patel, M. K., V.V. Bhatt & Y. S. Kulkarni: Ibid., 5: 116～120. (1953).
18) Rosental, S. A.: Abst. of Dissertation. (1952).
19) Rosental, S. A. & D. Cox: Jour. Bact., 65: 532～537. (1953).
20) ——・——: Phytopath., 44: 603～604. (1954).
21) Seliskar, C. E.: Colo. Fm. & Home Res., 2. 6: 6～11, 19～20. (1952).
22) Skaptason J. B. & W. H. Burkholder: Phytopath., 32: 439～440. (1942).
23) Starr, M. P.: Jour. Bact., 52: 187～193. (1946)
24) Starr, M. P.: Ibid., 57: 253～258. (1949).
25) Starr, M. P.: Bact. Rev., 19: 273. (1955).
26) Starr, M. P. & P.P. Pirone: Phytopath, 33: 1076～1081. (1942).

本 会 記 事

評議員選挙結果

昭和 32 年 12 月 14 日，選挙管理委員（明日山秀文，向秀夫，鈴木橋雄の3氏）立会の下に昭和33～34年度評議員選挙の開票を行つた。総投票数 360，有効投票 359，無効 1。得票数の上位から20名（アルファベット順）は次の通りである。

赤井重恭　明日山秀文　福士貞吉　後藤和夫　平井篤造　平塚直秀　堀正侃　今関六也　岩田吉人　河合一郎　向秀夫　村山大記　西門義一　岡本弘　小野小三郎　鈴木直治　田中一郎　田中彰一　田杉平司　吉井甫

植物病名調査委員会

昭和 33 年1月 11 日，病名，病原菌などを決定するための原則，編集の方針などについて協議し，また同年1月 31 日～2月1日，個々の病害について逐条審議した。

常任評議員会

昭和 33 年1月 11 日開催，学会賞選考を行つた。

地域部会

(1) 昭和32年12月7日，冬季関東部会が東京大学農学部で開かれた。

(2) 昭和 32 年 10 月26，27日，昭和32年度関西部会が京都大学農学部で開かれた。第1日目は稲紋枯病に関するシンポジウムを行い，高坂淖尓氏（稲紋枯病の発生と経過），橋岡良夫氏（稲紋枯病の有機水銀剤による防除とその作用機構）の両氏の講演を中心に討論が行われた。なお討論の記録を御希望の方は京都大学農学部植物病理学研究室へ申し込まれたい。1部120円，47 頁。第2日目は一般講演が行われた。なお，この日、総会を開いたが、席上、地域部会の性格及び活動を明確にするため，支部を設けたいという提案があつた。その結果出席者 107 名全員の賛同を得たので，西門，岡本，木谷，内藤，赤井，桂，島田，橋岡の8氏を準備委員として具体案を検討することとなった

会員消息

(1) 向秀夫，飯田俊武両氏（農技研）はキューバの稲ウイルス病調査のため，昭和 32 年3月出発，6 月帰国された。

(2) 吉井甫氏（九大）は昭和 32 年9月8～15日にハンブルグで開催された国際作物保護学会に出席のため，9 月出発，10 月帰国された。

(3) 岡本弘氏（中国農試）はセイロン島作物病害調査のため，昭和 32 年9月出発された。昭和 33 年4月帰国される予定である。

(4) 田杉平司氏（東北大），細辻豊二氏（日本農薬）の両氏は中国農業視察のため，昭和 32 年6月出発され，8 月帰国された。

(5) 赤井重恭氏（京大）は中国農業視察のため，昭和 32 年9月出発され，10 月帰国された。

(6) 高瀬昇氏（北海道農試）は欧米の馬鈴薯育種状況視察のため，昭和32年8月出発，11月帰国された。

(7) 後藤和夫氏（農技研）はかねてミネソタ大学で研究中であつたが，このたび帰途欧州を経て，昭和32年 12 月帰国された。

(8) 昭和 33 年8月4～9日，ストックホルムで開催される国際微生物学会に日高醇氏（秦野たばこ試験場）が出席の予定，平井篤造氏（名大）は講演要旨のみ提出される。

(9) 昭和 33 年6月9～15日，ブリュツセルで開催される国際たばこ会議に日高醇氏が出席の予定

(10) 昭和 33 年8月 24～28 日，ブルーミントンで開催されるアメリカ植物病理学会創立50周年記念国際シンポジウムに，本会福士会長が招聘された。

訂　正

会報22巻3号掲載の山本昌木氏論文中，次の個所を御訂正下さい。

1)149 頁，左欄の最下行の ro を ro と訂正する

2)150頁，Fig. 3の写真，a と c とを入替える

本会会員永井行夫氏（農林省林業試験場保護部）は昭和 32 年 12 月 28 日逝去せられた。謹んで哀悼の意を表する次第である。

本会会員原田倭男氏（神奈川県立農事試験場病虫部）は昭和 33 年2月 20 日逝去せられた。謹ん哀悼の意を表する次第である

昭和 32 年 12 月 25 日 印刷　日本植物病理学会報 （毎年5回発行） 定価 280 円　送料 24 円
昭和 32 年 12 月 31 日 発行　第 22 巻，第4・5号

発行所　東京都北区西ヶ原町農林省農業技術研究所内　日本植物病理学会

発売所　東京都文京区森川町 70 養賢堂内　日本植物病理学会事務取扱所（振替東京83339）

編集兼発行者　東京都目黒区下目黒4丁目農林省林業試験場　今関六也

印刷者　東京都文京区森川町70番地　養賢堂代表者　及川伍三治

Vol. XXII, No. 4—5 December, 1957

ANNALS OF THE PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY OF JAPAN

Presibent T. FUKUSHI

CONTENTS

ANNALS OF THE PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY OF JAPAN is published five times a year for present by the Phytopathological Society of japan.

BUSINESS CORRESPONDENCE concerning subscription and remittance from foreign countries should be made to:

YŌKENDŌ 70, Morikawachō, Bunkyō-ku, Tōkyō, Japan